

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/113981 A1

(43) Fecha de publicación internacional
22 de septiembre de 2011 (22.09.2011)

PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 9/107 (2006.01) A61K 31/7048 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01) A61P 31/10 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2011/070174
- (22) Fecha de presentación internacional:
14 de marzo de 2011 (14.03.2011)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P20100100854
17 de marzo de 2010 (17.03.2010) AR
- (71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): **CONICET -CONSEJO NAC. DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS** [AR/AR]; Av. Rivadavia 1917 - Piso 3, Of. "F", C.A. Buenos Aires, 1033 (AR). **CEPROCOR - CENTRO DE EXCELENCIA EN PROD. Y PROCESOS DE CÓRDOBA** [AR/AR]; Álvarez de Arenales 230 B° Júniors, Córdoba (AR).
- (72) Inventor; e
- (71) Solicitante : **BELTRAMO, Dante** [IT/ES]; C/Gral. Primo de Rivera, 14, - 4º dcha -, E-03002 Alicante (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **LEONHARD, Victoria** [AR/AR]; Bv. Los Andes 473 B° Cofico, Córdoba (AR). **ALASINO, Valeria** [AR/AR]; Dean Funes 447 B° Centro, Córdoba (AR). **BIANCO, Ismael** [AR/AR]; Aconcagua 1965 B° Parque, Córdoba (AR).
- (74) Mandatario: **SALIS, Eli**; c/Moratin, 25 - Entlo. D, E-03008 Alicante (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: WATER-SOLUBLE PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING AT LEAST ONE THERAPEUTICALLY ACTIVE SUBSTANCE HAVING HYDROPHOBIC PROPERTIES AND AT LEAST ONE COMPOUND SELECTED FROM AMONG SIALOGLYCOSPHINGOLIPIDS, GLYCOSPHINGOLIPIDS OR A MIXTURE OF SIALOGLYCOSPHINGOLIPIDS AND GLYCOSPHINGOLIPIDS

(54) Título : UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA SOLUBLE EN AGUA QUE COMPRENDE AL MENOS UNA SUSTANCIA TERAPÉUTICAMENTE ACTIVA DE CARACTERÍSTICAS HIDROFÓBICAS Y AL MENOS UN COMPUESTO SELECCIONADO ENTRE LOS SIALOGLICOSEFINGOLÍPIDOS, LOS GLICOSEFINGOLÍPIDOS O UNA

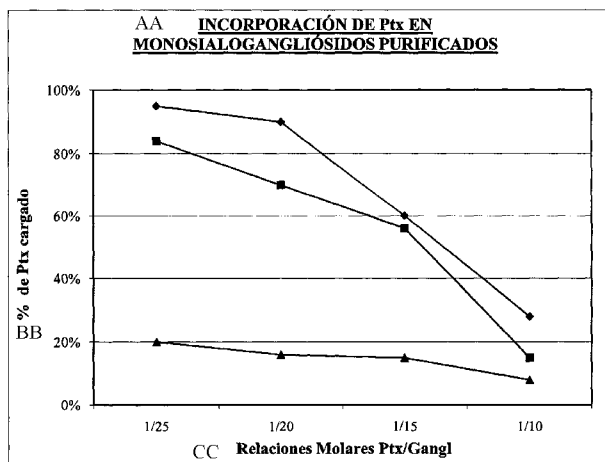


FIGURA 1

AA INCORPORATION OF PtX INTO PURIFIED MONOSIALOGLANGLIOSIDES
BB % of loaded PtX
CC PtX/Gangl molar ratios

(57) Abstract: The invention relates to water-soluble pharmaceutical compositions comprising at least one therapeutically active substance and at least one compound selected from among sialoglycosphingolipids, glycosphingolipids or a mixture of sialoglycosphingolipids and glycosphingolipids, in which at least one of the therapeutically active substances is a drug with hydrophobic characteristics. In particular, the invention relates to injectable sterile compositions formed by nanomicelles of glycosphingolipids or modified glycosphingolipids, which can be non-covalently coated with albumin and which allow the delivery and controlled release of highly hydrophobic molecules.

(57) Resumen:

[Continúa en la página siguiente]

WO 2011/113981 A1

- (84) Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*):
- ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:**
- *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*
 - *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*

Se revelan composiciones farmacéuticas solubles en agua, que comprenden al menos una sustancia terapéuticamente activa y al menos un compuesto seleccionado entre los sialoglicosfingolípidos, los glicosfingolípidos o una mezcla de sialoglicosfingolípidos y glicosfingolípidos, en donde al menos una de las sustancias terapéuticamente activas es una droga de características hidrofóbicas. En particular, se revelan composiciones, inyectables y estériles, formadas por nano-micelas de glicosfingolípidos o glicosfingolípidos modificados, las cuales pueden estar cubiertas en forma no covalente con albúmina y que permiten el transporte y la liberación controlada de moléculas altamente hidrofóbicas.

**UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA SOLUBLE EN AGUA
QUE COMPRENDE AL MENOS UNA SUSTANCIA
5 TERAPÉUTICAMENTE ACTIVA DE CARACTERÍSTICAS
HIDROFÓBICAS Y AL MENOS UN COMPUESTO
SELECCIONADO ENTRE LOS SIALOGLICOESFINGOLÍPIDOS,
LOS GLICOESFINGOLÍPIDOS O UNA MEZCLA DE
10 SIALOGLICOESFINGOLÍPIDOS Y GLICOESFINGOLÍPIDOS.**

10

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica soluble en agua, que comprende al menos una sustancia terapéuticamente activa y al menos un compuesto seleccionado entre los sialoglicoesfingolípidos, los glicoesfingolípidos o una mezcla de
15 sialoglicoesfingolípidos y glicoesfingolípidos, en donde al menos una de las sustancias terapéuticamente activas es una droga de características hidrofóbicas. En particular, la invención se refiere a una composición, inyectable y estéril, formada por nano-micelas de glicoesfingolípidos o glicoesfingolípidos modificados, las cuales pueden estar cubiertas en forma no covalente con albúmina y que permiten el transporte y la liberación controlada de
20 moléculas altamente hidrofóbicas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

25 La eficacia de muchas drogas, especialmente las de características hidrofóbicas, se encuentra limitada, principalmente, por su incapacidad para alcanzar el sitio correcto de acción terapéutica. En muchos casos, y aún cuando la droga es soluble en agua, sólo una pequeña fracción de la dosis administrada alcanza su sitio terapéutico, mientras que la mayor parte de la droga se distribuye a través de todo el cuerpo. Así, esta distribución en órganos y tejidos
30 sanos, limita frecuentemente su dosaje. Por lo tanto, una formulación farmacéutica –que contenga principios activos fuertemente hidrofóbicos- ideal, sería aquella que permita una gran solubilidad de la droga en medio acuoso, que sea estable como complejo sin disolución y que al mismo tiempo solo se concentre en el sitio de acción específico.

35 Entre los principios activos que presentan naturaleza hidrofóbica y que poseen una solubilidad en agua muy baja o limitada pueden mencionarse, por ejemplo, aquellos utilizados en tratamientos oncológicos (tales como el Paclitaxel, el Docetaxel y la Doxorrubicina), los antimicóticos (tales como la Anfotericina B), los hormonales (tal como la Progesterona) y los anestésicos (tal como el Propofol). También se incluyen las

prostaglandinas, el dinitrato de Isosorbide, la Testosterona, la Nitroglicerina, el Estradiol, la vitamina E, la Cortisona, la Dexametasona y sus ésteres, y el Valerato de Betametasona.

En particular, el paclitaxel (Ptx) es un compuesto diterpeno con propiedades anticancerígenas derivado del árbol *Taxus brevifolia*. Su utilidad en el tratamiento del cáncer fue propuesta luego de que un extracto crudo de la planta antes mencionada, reveló presentar actividad antineoplásica en un estudio preclínico realizado por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de Norteamérica, hace alrededor de 30 años.

El Ptx, es una molécula que interacciona y promueve la polimerización de la tubulina, para formar microtúbulos (MT) muy estables. Esta estabilización de los MT resulta en la inhibición de la dinámica normal de la reorganización de la red microtubular. Esto es lo opuesto a lo que ocurre con otros agentes antimicrotubulares como, por ejemplo, la colchicina, la vincristina o la vinblastina, los cuales producen el desensamblamiento de los MT.

Una de las mayores dificultades que se encontraron en el desarrollo de medicamentos conteniendo Ptx, utilizables en la terapéutica del cáncer, ha sido su gran insolubilidad en agua. Las formulaciones de drogas con baja solubilidad en agua han sido tradicionalmente elaboradas bajo la forma de emulsiones o asociando las drogas con coloides, tales como las micelas, los cuales disuelven las drogas y, por lo tanto, incrementan su concentración en medio acuoso. Específicamente, el Ptx es un compuesto muy poco soluble en agua (menos de 10 µg/ml), por lo que se han estudiado distintos vehículos para que el mismo pueda ser aplicado por vía parenteral. De hecho, ciertos solventes orgánicos, pueden disolver parcialmente el Ptx; no obstante, cuando se diluye en un medio acuoso un solvente miscible con el agua que lo contiene y en el cual el PTX se encuentre en una concentración cercana a la de su punto de saturación, la droga comienza a precipitar.

Debido a ello, para la administración de la droga en humanos en los distintos ensayos clínicos, se formularon composiciones de PTX utilizando 50% Cremofor EL/50% alcohol deshidratado, diluido ya sea en solución fisiológica o en dextrosa 5% en agua, hasta una concentración final de Cremofor EL y de alcohol deshidratado del 5% o menos.

La forma inyectable de Ptx, es actualmente comercializada internacionalmente por Bristol-Myers Squibb Co. (New York, N.Y.) en una sola dosis de 30 mg (5 ml).

Cada mililitro de la formulación contiene aproximadamente 6 mg de Ptx, 527 mg de Cremofor EL, y 49,7 % (vol/vol) de alcohol deshidratado. Para su administración, esta formulación concentrada puede ser diluida con solución fisiológica, 5% dextrosa en agua, 5%

dextrosa en fisiológica o bien solución Ringer con 5% dextrosa en agua (Goldspiel, 1994, "Pharmaceutical Issues: Preparation, Administration, Stability, and Compatibility with Other Medications" Ann. Pharmacotherapy, vol. 28, pp. S23-26. Harvey Whitney Books Company). No obstante, es de destacar que la formulación de Ptx en Cremofor/etanol al ser diluida en medio acuoso, comienza a inestabilizarse, observándose con el tiempo la aparición de precipitados fibrosos. Las formulaciones de Ptx en Cremofor se encuentran reveladas en la patente US 5,504,102.

Como ocurre con la mayoría de los agentes quimioterapéuticos, la dosis máxima tolerada de Ptx se encuentra limitada por su toxicidad. En humanos, los mayores efectos tóxicos del Ptx se observan a concentraciones que van desde alrededor de los 100 hasta alrededor de los 250 mg/m². Por ejemplo, entre los efectos adversos, en la literatura se encuentran mencionados la granulocitopenia (Holmes F. A. y col., "Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer", *J Natl Cancer Inst.* 1991, 83:1797–1805) y la neuropatía periférica sintomática, siendo esta última la principal toxicidad no hematológica (Rowinsky E. K. y col., 1995, Review Article. Drug Therapy – Paclitaxel (Taxol) N. Engl. J. Med. Vol 332:1004-1014 N.15).

Más recientemente, el Ptx fue preparado en una formulación, tanto en estado sólido, como en estado líquido, para su aplicación en forma parenteral. En la patente US 6,743,826 se describe un método para obtener Ptx soluble por medio de la interacción con albúmina humana o albúmina humana recombinante. Por otra parte, en la solicitud de patente US 2005282734 A1, se describe una formulación liofilizada o una composición soluble en agua, que contiene Ptx o Docetaxel, unidos a albúmina humana donde la concentración de Ptx es mayor a los 500 ug/ml. Sin embargo, en dicha solicitud no se revela explícitamente cual sería la solubilidad del Ptx en la formulación.

La molécula de albúmina, juega un rol central en el *delivery* de moléculas hidrofóbicas tales como el Ptx. Su dirección en los distintos tejidos está relacionada a la capacidad de interacción de la albúmina con los receptores celulares y por la acumulación celular (Gradishar W.J., 2006, "Albumin-bound paclitaxel: A next-generation taxane,. Expert Opin Pharmacother; 7:1041–1053). El complejo albúmina-Ptx es reversible, una condición que le permite ser transportada en el organismo y ser liberada en la superficie celular.

Por medio de la unión al receptor, la albúmina inicia la denominada transcitosis del complejo albúmina-Ptx a través de la pared de las células endoteliales de los vasos sanguíneos, facilitando el pasaje del complejo Albúmina-Ptx (denominado ABI-007) al complejo intersticial y, por lo tanto, permitiendo su exposición directa a la superficie del tumor (Ibrahim N.K. y col., 2002, "Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-

free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel”, Clin Cancer Res-;8:1038–1044; Gradishar W.J., 2006, “Albumin-bound paclitaxel: A next-generation taxane”, Expert Opin Pharmacother, 7:1041–1053; Drummond D.C. y col., 1999, “Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors”. Pharmacol Rev.;51:691–743). La

5 albúmina se acumula en los tumores, posiblemente y en parte, como resultado de la secreción de la denominada proteína fijadora de albúmina, (SPARC, *secreted protein, acidic and rich in cysteine*, también llamada BM-40), lo cual puede resultar en la acumulación intratumoral de Ptx unido a la albúmina (Fukunaga-Kalabis M. y Herlyn M., 2007, “Unraveling mysteries of the multifunctional protein SPARC”, J Invest Dermatol;127:2497–2498). Por otra parte,

10 recientemente, otras estrategias para obtener Ptx soluble en agua han sido reveladas en la literatura especializada tales como, por ejemplo, mediante su conjugación a polímeros como el poliglutámico (patente US 7,384,977).

Por otro lado, otra molécula altamente hidrofóbica es la Anfotericina B (AmB), un antibiótico poliénico. Esta molécula actúa esencialmente por interacción con los esteroides, tales como el

15 ergosterol presente en las membranas de los hongos, incrementando su permeabilidad. No obstante, el uso de Anfotericina B en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas, está fuertemente asociado con daño renal extensivo. (Bennet J.E., 1996 “Antimicrobial agents”. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A, editors. Goodman and Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th ed. New York: McGraw Hill,; 1175-90.) Probablemente, la toxicidad observada en humanos se encontraría asociada al hecho que interacciona con el colesterol presente en todas las células de mamíferos.

Para resolver estos problemas, la AmB fue inicialmente preparada en una formulación micelar, la cual fue aprobada por la FDA y se comercializa con la denominación de Anfostat.

25 Mas tarde, una formulación liposomada de Anfotericina B, comercializada como Ambisome, fue desarrollada (Boswell G.W. y col., 1998, “AmBisome (Liposomal amphotericin B): A comparative review”, J Clin Pharmacol vol.38:583-92). Dicho producto fue la primera formulación liposomal que fue aprobada para su uso clínico en el tratamiento de las infecciones fúngicas sistémicas, (Gray A. y Morgan J. (1991) Liposomes in hematology. Blood

30 Rev; 258-271).

La Anfotericina B liposomada a dosis normales se caracteriza por dirigirse de manera preferencial al hígado y al bazo, reduciendo significativamente así la toxicidad renal característica de la Anfotericina B (Boswell G.W. y col., 1998, “AmBisome (Liposomal amphotericin B): A comparative review”, J Clin Pharmacol vol.38:583-92; Ahmad I. y col.,

35 1991, “Tissue distribution and antileishmanial activity of liposomised amphotericin-B in BALB/c mice”. J Biosci. vol16:217-21). No obstante, cuando se utiliza en dosis elevadas, la

toxicidad renal vuelve a aparecer (Longuet P. y col., 1991, "Limited protection by small unilamellar liposomes against the renal tubular toxicity induced by repeated amphotericin B infusion in rats". *Antimicrob Agent Chemother*; vol.35:1303-1308). Aparentemente, esta toxicidad se debería a la saturación del mecanismo de captación de los macrófagos a nivel del hígado y del bazo.

El Ambisome, puede también ser utilizado para el tratamiento de las infecciones parasíticas droga-resistentes del sistema reticuloendotelial (Davidson R.N. y col., 1991, "Liposomal amphotericin B in drug-resistant leishmaniasis"; *Lancet* vol.337:1061-1062). De hecho, la capacidad de los liposomas para ser capturados por los macrófagos y concentrarse en el hígado y el bazo indudablemente lo hacen ideal para el tratamiento de enfermedades de estos órganos tales como, por ejemplo, la leishmaniasis.

Además, resulta interesante que los liposomas pueden también ser dirigidos hacia el pulmón cuando se les realiza un recubrimiento con o-stearoil amilopectina y polioxietileno o monosialogangliósidos. (Deol P, Khuller GK. (1997) "Lung specific stealth liposomes: stability, biodistribution and toxicity of liposomal antitubercular drugs". *Biochim Biophys Acta* vol.1334:161-72).

La encapsulación en liposomas de agentes anti-tuberculosis como la rifampicina o la isoniazida, modula o regula su toxicidad (Deol P. y Khuller G. K., 1997, "Lung specific stealth liposomes: stability, biodistribution and toxicity of liposomal antitubercular drugs", *Biochim Biophys Acta* vol.1334:161-72) y mejora la eficacia de estas drogas (Deol P. y col., 1997, "Therapeutic efficacies of isoniazid and rifampin encapsulated in lung-specific stealth liposomes against *Mycobacterium tuberculosis* infection induced in mice". *Antimicrob Agent Chemother* vol.41:1211-4). Liposomas convencionales son formulados para llevar drogas u otros agentes activos en la fase acuosa de su espacio interior (drogas solubles en agua) o bien particionadas en la bicapa lipídica (drogas insolubles en agua). El encapsulamiento de varias drogas antitumorales o antimicóticas en liposomas convencionales, ha demostrado disminuir los efectos citotóxicos colaterales producidos por la droga, manteniendo o, en algunos casos, incrementando el efecto antitumoral o terapéutico deseado. Esta reducción en la citotoxicidad resulta de la capacidad de los liposomas de disminuir la exposición de la droga, y el consecuente daño, en los tejidos indeseados.

El mecanismo de acción de las drogas antitumorales o antimicóticas encapsuladas, no se encuentra completamente entendido aunque, se cree, podría resultar o bien consecuencia de la capacidad de los liposomas para liberar lentamente en el torrente circulatorio una droga encapsulada, o bien de la interacción del liposoma con la superficie del tumor, para liberar lentamente la droga directamente en el sitio del tumor. Sin embargo, un grave problema que presentan las drogas encapsuladas en liposomas es que se ha encontrado que estas drogas

son rápidamente liberadas de los liposomas luego de su encapsulación. Mas aún, drogas fuertemente lipofílicas (insolubles en agua) que particionan en la bicapa lipídica de un liposoma parecen, en algunos casos, modificar marcadamente las propiedades físicas de las membranas, en un grado tal que la propia membrana se inestabiliza y ya no puede retener la
5 droga, liberándola al medio. En base a estas observaciones, lo que se debería lograr es que, en un sistema encapsulante de drogas como son los liposomas, se pueda proteger al liposoma estabilizándolo de modo de prevenir estas interacciones indeseadas entre liposoma-droga.

Por otra parte, el uso de liposomas para direccionar específicamente un fármaco por la vía sanguínea, se encuentra severamente limitado por su rápida remoción por las células del
10 sistema retículo endotelial (RES), las cuales se encuentran localizadas primariamente en hígado y bazo. De hecho, ha sido bien establecido que los liposomas más pequeños, se ven favorecidos con un aumento del tiempo de circulación en la sangre (patente US 5,225,212). No obstante, como contraparte, los liposomas pequeños presentan un volumen intravesicular pequeño, lo que les permite cargar dosis reducidas de fármacos, haciéndolos poco prácticos a
15 nivel terapéutico. Otros intentos para resolver estos problemas ha sido el uso de la microencapsulación de Ptx en estructuras tales como los liposomas y las nano-esferas (Bartoni D. y Boitard R., 1990, “*In vitro* and *in vivo* antitumoral activity of free and encapsulated taxol”, J. Microencapsulation, vol. 7:191-197). En particular, la formulación de liposomas demostró ser al menos tan efectiva como el Ptx aislado. Sin embargo, sólo fueron
20 estables físicamente aquellas formulaciones con un contenido menor al 2% de Ptx (Sharma A. y col., 1995, “Antitumor efficacy of taxane liposomes on a human ovarian tumor xenograft in nude athymic mice”. J. Pharm. Sci. vol. 84: 1400-4; Sharma U. S. y col. 1995 “Pharmaceutical and physical properties of paclitaxel (taxol) complexes with cyclodextrins”. J. Pharm. Sci. vol.84: 1223-30). Por otra parte, la formulación de nano-esferas resulto ser tóxica.

25 Una propiedad muy importante que se debería lograr en estas formulaciones es un incremento en el tiempo de circulación plasmática. Los estudios de biodistribución se llevan a cabo sobre órganos o tejidos específicamente seleccionados, analizando el contenido de los lípidos de los liposomas utilizados o de las drogas en estudio, en muestras obtenidas de la homogeneización de los tejidos. El agregado a los liposomas de moléculas lipídicas con
30 azúcares, o lípidos conteniendo grupos aminos, tales como el monosialogangliósido GM1, reduce significativamente la acumulación de los lípidos del liposoma en el hígado y el bazo. Por ejemplo, en el caso de la droga vincristina, una formulación combina un pH interno del liposoma de 2 y la presencia de GM1 en la bicapa del liposoma. La administración endovenosa de esta formulación conteniendo 2, 3 ó 4 mg/Kg de droga, a ratones inoculados
35 con células tumorales P388, fue capaz de producir un gran sobrevida en los animales respecto de los controles. Varios laboratorios también han evaluado la posibilidad de

incrementar el tiempo de vida medio de circulación de los liposomas diseñando artificios para la superficie de los mismos que los hagan similares a los glóbulos rojos (GR).

El rol de los carbohidratos de superficie en el reconocimiento celular es un fenómeno
5 ampliamente estudiado (Ashwell G. y Morell A.G., 1974, "The role of surface carbohydrates in
the hepatic recognition and transport of circulating glyco-proteins", *Adv Enzymol* 41:99-128;
Hakormori S., 1981, "Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and
oncogenesis". *Annu Rev Biochem.* vol. 50:733-764). Asimismo, la química, el metabolismo y
las funciones biológicas de los gangliósidos y del ácido siálico, han sido profundamente
10 estudiadas (Schauer, R., 1982, "Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic
acids", *Adv. Carbohydrate Chem. Biochem.* 40, 131-23; Ledeen R. W. y col., 1998,
"Sphingolipids as signaling modulators in the nervous system", *Annals of the New York
Academy of Science*, Vol 845). Ha sido descrito que la incorporación del gangliósido GM1 en
liposomas compuestos de fosfatidil colina (PC) y colesterol incrementa significativamente el
15 tiempo de vida media de circulación de los mismos (Bedu-Addo F.K. y L. Huang, 1996,
"Effect of matrix lipid chain length on liposomes containing cholesterol and ganglioside GM1:
Implications in drug delivery", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 85, Issue 7 ,
Pages 714 - 719).

20 Los resultados presentados y los comentarios anteriores demuestran claramente la necesidad
vigente que existe de desarrollar formulaciones que contengan sustancias hidrofóbicas,
solubles en agua y que puedan contener cantidades efectivas de dichas sustancias activas,
tales como, por ejemplo, Paclitaxel, Docetaxel y Anfotericina B pero que no presenten las
desventajas causadas por la insolubilidad de las drogas arriba mencionadas.

25 Otras estrategias para la formulación de drogas muy poco solubles en agua ha sido
tradicionalmente el uso de emulsiones y otras asociaciones coloidales tales como, por
ejemplo, las micelas, un tipo de estructura que disuelve las drogas y, además, incrementa su
concentración en medio acuoso (Patente 6,296,870). Sin embargo, estas emulsiones, y
30 particularmente las suspensiones de micelas, no son necesariamente estables y dirigibles a
sitios anatómicos específicos. Es conocido que las emulsiones y las micelas conteniendo
agentes activos son más móviles que los liposomas. En general, las micelas son consideradas
estables sólo cuando se encuentran en equilibrio con el monómero surfactante con el que está
formada la micela. Por lo tanto, en ausencia del monómero equilibrante, las micelas se
35 desarman en el monómero soluble en agua y, finalmente, la micela termina disolviéndose
totalmente con el tiempo. De la misma manera, en ausencia del monómero equilibrante, las
gotas de una microemulsión coalescen en grandes gotas, las cuales finalmente se pierden. De
esta manera, cuando una preparación de micelas se diluye, por ejemplo, debido a la
administración endovenosa, las micelas se disuelven y dispersan en el medio, liberando su



contenido en el torrente sanguíneo en cuestión de segundos. Asimismo, en lo que respecta a las preparaciones de emulsiones, estas presentan el mismo principio de inestabilidad.




Otros mecanismos de remoción rápida en el torrente sanguíneo, se producen mediante la
5 captura de las drogas, en micelas o emulsionadas, por parte de las lipoproteínas.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 **Figura 1:** Muestras conteniendo 100mg de monosialogangliósido **GM1** (—◆—), **GM2** (—■—) y **GM3** (—▲—) fueron disueltas en 1 ml de agua destilada a pH 5, o en 1 ml de solución tampón de acético-acetato 20 mM a pH 5, con suave agitación hasta lograr una completa disolución. Esta solución se dejó reposar por al menos 24hs a 4 u 8 °C. La solución transparente, fue luego centrifugada a 50.000 xg durante 15 minutos y el sobrenadante fue
15 filtrado por poros de 0,22 micras. Alícuotas de 0.5 ml de cada solución de 100 mg/ml de monosialogangliósido fueron incubadas con 50 microlitros de DMSO conteniendo una cantidad creciente de Paclitaxel (Ptx), para alcanzar las siguientes relaciones de Ptx-Gangliósido: 1/25, 1/20, 1/15 y 1/10. Las soluciones fueron incubadas a 4°C durante una hora y luego fueron centrifugadas a 15,000 xg durante 15 min, para remover el material de Ptx
20 insoluble que no hubiese sido encapsulado en las micelas. Finalmente, las muestras fueron dializadas frente agua destilada o solución de acético-acetato 20 mM a pH 5, durante 24hs, con el objeto de remover todo el DMSO. La cuantificación del Ptx se realizó por HPLC.

Figura 2: Muestras conteniendo 100 mg de monosialogangliósido GM1 fueron disueltas en 1
25 ml de agua destilada a pH 5 ó en 1 ml de solución tampón de acético-acetato 20 mM a pH 5, con suave agitación, hasta lograr una completa disolución. Esta solución se deja reposar durante, al menos, 24hs a 4 u 8 °C. La solución transparente, fue luego centrifugada a 50.000 xg durante 15 minutos y el sobrenadante fue filtrado por poros de 0,22 micras. Alícuotas de 0.5 ml de 100mg/ml fueron incubadas con 50 microlitros de DMSO conteniendo una
30 cantidad creciente de Ptx, para alcanzar las siguientes relaciones de Ptx-GM1: 1/100, 1/50, 1/25 y 1/11. Las soluciones fueron incubadas a 4°C por una hora y luego centrifugadas a 15,000 xg durante 1 min, para remover el material de Ptx insoluble que no hubiese sido encapsulado en las micelas de GM1. Finalmente, las muestras fueron dializadas frente a agua
35 destilada o a solución de acético-acetato 20 mM a pH 5, durante 24 hs, con el objeto de remover todo el DMSO. Una alícuota de 400ul de cada muestra se inyectó en un equipo AKTA Explorer de filtración molecular, usando una columna Sephadex G200 y un buffer de corrida Fosfato pH 7 50mM con NaCl 150mM. Se determinaron los siguientes pesos moleculares:

40 GM1  65 KDa (micelas) y 1.6KDa (monómeros)
Ptx/GM1: 1/100  350 KDa

Ptx/GM1: 1/50  315 KDa
 Ptx/GM1: 1/25  280 KDa
 Ptx/GM1: 1/11  255 KDa





5

Figura 3: Muestras conteniendo 100 mg de GM1 (—◆—) y LIGA (—■—) fueron disueltas en 1 ml de agua destilada a pH 5, o en 1 ml de solución tampón de acético-acetato 20 mM a pH 5, con suave agitación, hasta lograr una completa disolución. Esta solución se dejó reposar por al menos 24hs, a 4 u 8 °C. La solución transparente fue luego centrifugada a 50.000 xg durante 15 minutos y el sobrenadante fue filtrado por poros de 0,22 micras. Alícuotas de 0.5 ml de 100mg/ml de cada solución fueron incubadas con 50 microlitros de DMSO conteniendo una cantidad creciente de Ptx para alcanzar las siguientes relaciones de Ptx-GM1 o Ptx-LIGA: 1/25, 1/20, 1/15 y 1/10. Las soluciones fueron incubadas a 4°C por una hora y luego centrifugadas a 15,000 xg durante 15 min para remover el material de Ptx insoluble que no hubiese sido encapsulado en las micelas de GM1. Finalmente, las muestras fueron dializadas frente a agua destilada o a solución de acético-acetato 20 mM de pH 5, por 24 hs, a los fines de remover todo el DMSO. La determinación del Ptx asociado a las micelas se determinó por HPLC.

20

Figura 4: Soluciones de GM1 fueron incubadas con una cantidad creciente de Ptx, para alcanzar las siguientes relaciones molares de Ptx-GM1: 1/100, 1/50, 1/25, 1/20, 1/15, 1/10 y 1/5. La cuantificación de Ptx incorporada en las micelas de GM1 se llevó a cabo mediante HPLC.

25

Figura 5: Se cargó Ptx en las micelas de gangliósidos en relaciones 1/10, 1/15, 1/20 y 1/25. La carga se realizó durante 30 minutos a una temperatura de A-() o °C, B-() GM1 precalentado a 55 °C y carga de Ptx a 0 °C, C-() GM1 precalentado a 55 °C y carga de Ptx a 25 °C y D-() GM1 precalentado y cargado a 55 °C. La cantidad de Ptx incorporada en forma soluble en la micela de GM1 fue cuantificada por HPLC.

30

Figura 6: Células de origen no-tumoral VERO y MA, fueron incubadas con concentraciones crecientes de: a)- (—■—) Ptx en DMSO, b)- (—▲—) micelas de Ptx-GM1 1/25, c)- (—◆—) micelas de GM1 y d)- (—✕—) micelas del complejo GM1-Ptx-albúmina. La viabilidad celular se evaluó utilizando la marcación con MTT luego de 24 hs de incubación.

35

Figura 7: Células de origen tumoral HEP-2 y HELA, fueron incubadas con concentraciones crecientes de: a)- (—■—) Ptx en DMSO, b)- (—▲—) micelas de Ptx-GM1 1/25, c)- (—◆—) micelas de GM1 y d)- (—✕—) micelas del complejo GM1-Ptx-albúmina. La viabilidad celular se evaluó utilizando la marcación con MTT luego de 24 hs de incubación.

40

VER Figura 8: Muestras de GM1 (—◆—) y de complejos Ptx-GM1:1/25 (—■—) fueron incubadas con concentraciones crecientes de Doxorubicina (Dox), de modo de alcanzar relaciones molares del complejo Dox-GM1 de 1/10, 1/5, 1/ 2.5 y 1/1. La cuantificación de la Dox incorporada en las micelas fue realizada por espectrofotometría a 492 nm.

5

Figura 9: Micelas de GM1, conteniendo 5 mg/ml de GM1 fueron incubadas en presencia de cantidades crecientes de albúmina sérica humana purificada de modo de alcanzar las siguientes concentraciones: 0.83, 1.67, 5, 15 y 30 mg/ml de concentración final, las cuales representan relaciones GM1-Alb en masa: 6/1 (.....), 3/1 (.....), 1/1 (.....), 1/3 (.....) y 1/6 (.....) respectivamente. Las incubaciones fueron llevadas a cabo a 37°C , durante 3 horas. La figura **A** corresponde a la corrida cromatográfica completa, mientras que la **B** representa el recuadro señalado en A, y que corresponde a los picos obtenidos a mayores pesos moleculares (PM).

10

15

Figura 10: Micelas de Ptx-GM1, conteniendo 5 mg/ml de GM1 y una relación molar Ptx-GM1 de 1/25, fueron incubadas en presencia de cantidades crecientes de albúmina sérica humana purificada de modo de alcanzar las siguientes concentraciones: 0.83, 1.67, 5, 15 y 30 mg/ml de concentración final, las cuales representan relaciones GM1-Alb en masa: 6/1 (.....), 3/1 (.....), 1/1 (.....), 1/3 (.....) y 1/6 (.....) respectivamente. Las incubaciones fueron hechas a 37°C durante 3 horas. La figura **A** corresponde a la corrida cromatográfica completa, mientras que la **B** representa el recuadro señalado en **A**, correspondiente a los picos obtenidos a mayores PM.

20

25

Figura 11: Micelas de Ptx-GM1 con una relación molar Ptx-GM1 de 1/25, fueron incubadas en presencia de una concentración fija de albúmina sérica humana purificada, de modo de alcanzar la relación GM1-Alb en masa: 1/1. Se realizaron incubaciones a 4 °C por tiempos de 1h (.....), 4hs (.....) y 24hs (.....). La figura **A** corresponde a la corrida cromatográfica completa, mientras que la **B** representa el recuadro señalado en **A**, correspondiente a los picos obtenidos a mayores PM.

30

Figura 12: Micelas de Ptx-GM1 con una relación molar Ptx-GM1: 1/25, fueron incubadas en presencia de una concentración fija de albúmina sérica humana purificada de modo de alcanzar una relación GM1-Alb en masa de 1/1. Se realizaron incubaciones a 37 °C por tiempos de 1h (.....), 4hs (.....) y 24hs (.....). La figura **A** corresponde a la corrida cromatográfica completa, mientras que la **B** representa el recuadro señalado en **A**, correspondiente a los picos obtenidos a mayores PM.

35

Figura 13: Micelas de Ptx-GM1 con una relación molar Ptx-GM1 de 1/25, fueron incubadas en presencia de una concentración fija de albúmina sérica humana purificada de modo de alcanzar la relación GM1-Alb en masa de 1/1. Se realizaron incubaciones a 55 °C por tiempos

de 1h (.....) y 4hs (.....). También se incluye en la figura una muestra de Albúmina incubada por 4hs a 55 °C (.....) como control de estabilidad de la proteína a esa temperatura.

5 **Figura 14:** Soluciones de GM1 fueron incubadas con AmB, de modo de obtener una relación molar final de GM1 a AmB de 1/5 (.....), 1/1 (.....), 5/1 (.....) y 25/1 (.....). Se realizó una curva espectral de cada muestra desde 300 a 500 nm. En la figura se anexó una muestra de AmB en etanol (.....) como control del estado monómero que adopta la AmB. Las muestras 1/5 y 1/1 adoptan una forma agregada que presenta un máximo de absorción a 345 nm; mientras que las muestras 5/1 y 25/1 adoptan una forma monomérica con picos máximos de absorción a 365, 385 y 410 nm.

15 **Figura 15:** Micelas de AmB-GM1 con relaciones molares comprendidas entre 5/1 (—◇—), 2.5/1 (—◆—), 1/1 (—+—) y 1/2.5 (—*—) fueron preparadas usando una concentración fija de AmB de 16 ug/ml. Se preparó un control de micelas de GM1 (—■—) y otro de AmB (—▲—), para evaluar el efecto de cada una de ellas por separado, así como un control positivo (—■—) y otro negativo (—◆—) para el crecimiento del microorganismo. Las diferentes preparaciones de GM1-AmB y sus respectivos controles, fueron incubados en presencia de una solución de *Candida Albicans* a una concentración de 1×10^5 células/ml, en una placa de 96 pocillos por 24hs a 37°C. Se hicieron diluciones seriadas en la placa hasta alcanzar una concentración final de AmB de 0.0625ug/ml. Finalizada la incubación, la turbidez de la solución, la cual representa el crecimiento del microorganismo, fue evaluada por espectrofotometría a 610nm.

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La invención abarca a las composiciones farmacéuticas solubles en agua, que comprendan al menos una sustancia terapéuticamente activa y al menos un compuesto seleccionado entre los sialoglicoesfingolípidos, los glicoesfingolípidos o una mezcla de sialoglicoesfingolípidos y glicoesfingolípidos, en donde al menos una de las sustancias terapéuticamente activas es una droga de características hidrofóbicas. De preferencia, la droga de características hidrofóbicas se seleccionan entre las drogas antitumorales y las drogas antimicóticas.

35 En una realización particular, una composición de acuerdo con la invención será adecuada para ser administrada a un paciente que así lo necesite, de manera inyectable. En una realización más particular, la composición de la invención es una composición inyectable estéril y translúcida.

De preferencia, la composición farmacéutica de la invención comprende al menos un glicosfingolípido el cual se selecciona, preferentemente, entre los gangliósidos. En realizaciones particulares, los gangliósidos se seleccionan entre los monosialogangliósidos, los disialogangliósidos, los trisialogangliósidos o una mezcla de los mismos. Más particularmente aún, los monosialogangliósidos se seleccionan entre GM1, GM2 o una mezcla de los mismos, los disialogangliósidos se seleccionan entre GD1a, GD1b o una mezcla de los mismos y el trisialogangliósido es el GT1. La invención también contempla que la composición farmacéutica comprenda una mezcla de monosialogangliósidos y disialogangliósidos, una mezcla de monosialogangliósidos y trisialogangliósidos o una mezcla de disialogangliósidos y trisialogangliósidos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Para poder utilizar adecuadamente estructuras micelares como un sistema de carga y transporte para la liberación de drogas en el torrente sanguíneo, se hace necesario, sin lugar a dudas, el poder mejorar el comportamiento de las micelas del arte previo en los siguientes aspectos claves:

- 1- evitar los problemas relacionados con la disolución de las micelas por el fenómeno de la dilución,
- 2- poder obtener una estructura con una superficie, o con propiedades fisicoquímicas y/o eléctricas, que se mimeticen con los glóbulos rojos, de manera de evitar la interacción con los mismos y,
- 3- posibilitar que las micelas puedan ser cubiertas con polímeros o proteínas que puedan: i) estabilizar los complejos micelas-drogas y/o ii) servir como agentes que direccionen las micelas al sitio deseado.
- 4- Poder obtener una estructura con el menor tamaño posible a los fines de evitar la rápida eliminación del torrente sanguíneo por el sistema retículo endotelial
- 5- Como contraparte, que presente un peso molecular superior a los 40 kDa, para evitar su rápida eliminación por el sistema renal.

Los inventores de la presente han desarrollado una estrategia novedosa que mejora sustancialmente los problemas del arte previo mencionados anteriormente y, en particular, han desarrollado una nueva formulación en base a nano-micelas estables que permiten cargar elevadas concentraciones de drogas hidrofóbicas.

Así, de acuerdo con la presente invención, se propone el uso de un nuevo tipo de micelas, basadas en el empleo de moléculas anfipáticas, tales como los gangliósidos. Estas moléculas

se caracterizan por presentar, a diferencia de todas las otras micelas poliméricas, una muy baja concentración micelar crítica (cmc). Los gangliósidos y especialmente los monosialogangliósidos GM1 y GM2 presentan una cmc del orden de 10^{-8} M, lo cual permite incrementar sustancialmente la estabilidad de la estructura micelar. En particular, se propone el uso de gangliósidos por sobre su cmc, lo cual permite obtener estructuras con alto contenido en ácido siálico y así obtener una electronegatividad similar a la presente en los glóbulos rojos.

Se ha mencionado previamente, la importancia que tiene la presencia de ácido siálico en las moléculas de gangliósidos y glicoproteínas tales como, por ejemplo, la glicoforina, en las propiedades de superficie de las membranas celulares. El ácido siálico, además, juega un rol en la sobre vida de los GR, los trombocitos y los linfocitos en circulación. La remoción enzimática del ácido siálico, la cual expone el terminal galactosa, resulta en una rápida remoción de los GR circulantes y en su captación por las células de Kupffer presentes en el hígado.

En una realización particular, los autores describen que el PM de la micela de gangliósidos con paclitaxel oscila entre 150 y 350 kDa-

Los inventores de la presente han podido demostrar la alta estabilidad de las micelas de gangliósidos, en particular aquellas compuestas por GM1, por medio del equilibrio de diálisis. Los resultados muestran que aproximadamente el 12% del total de las micelas de GM1 se pierden después del 72hs de diálisis, resultados que se encuentran en coincidencia con los datos publicados por Formisano y col. ("Critical micelle concentrations of gangliosides"; 1979, *Biochemistry* 18:1119-1124). No obstante, si las micelas se cargan con una droga hidrofóbica, tal como por ejemplo Ptx o Dtx, formando el complejo GM1-Ptx o GM1-Dtx, la cantidad droga que se pierde por diálisis, ahora resulta menor al 2%, lo cual demuestra que la molécula hidrofóbica estaría regulando el propio mecanismo de disociación de la micela, favoreciendo un estado estabilizado de la forma micelar. Asimismo, las micelas de gangliósidos, en particular las compuestas por GM1, pueden cargarse con otras drogas oncológicas, tales como por ejemplo la Doxorubicina (Doxo), para formar el complejo GM1-Doxo.

En una realización particular, el sistema de micelas compuesto por gangliósidos, en particular los compuestos por GM1, permiten también incorporar, en forma simultánea, dos drogas oncológicas sobre la misma estructura micelar: la más hidrofóbica, tal como por ejemplo el Ptx o el Dtx, en el interior de la micela y la más hidrofílica tal como, por ejemplo, Doxo, en el área superficial de la micela, permitiendo así obtener un complejo ternario de GM1-Ptx-Doxo estable y soluble en agua.

En las condiciones propuestas de acuerdo con la invención, las nano-micelas de GM1, como así también las de GM1-Ptx o GM1-Ptx-Doxo, pueden interaccionar en forma espontánea, de forma no-covalente y por medio de una interacción de tipo hidrofóbica, con una molécula de albúmina, de manera de formar un nuevo complejo o estructura fuertemente estabilizada. Dicho complejo puede iniciar, por medio de la unión de la albúmina al receptor, la transcitosis a través de las células endoteliales hacia el espacio intersticial, lugar donde se encuentra el tejido tumoral, tal como ha sido demostrado para el complejo Albúmina-Ptx (denominado como ABI007).

5

Por otra parte, y en realizaciones particulares, el complejo GM1-Ptx puede ser vehiculizado en humanos, mediante su inserción previa en bolsas de transfusión conteniendo albúmina humana, suero humano completo o bien plasma humano completo, donde el complejo GM1-Ptx se unirá específicamente con la albúmina para rendir el complejo ternario o cuaternario biológicamente activo, GM1-Ptx-Alb o bien GM1-Ptx-Doxo-Alb.

10

Una ventaja de las composiciones de la presente invención, es que la retención en forma soluble en medio acuoso de un agente bioactivo hidrofóbico se encuentra aumentada por la elevada estabilidad que se observa en estas micelas de gangliósidos, debido a su baja cmc (la cual se encuentra en el orden de $10^{-8}M$), por lo que el tiempo de circulación del agente bioactivo en esta estructura se ve incrementado. Por otra parte la actividad terapéutica de dicha composición se encuentra significativamente mejorada debido a que también produce una marcada disminución de los efectos colaterales indeseados.

20

25

Es por lo tanto, uno de los objetos de la presente invención, una formulación que presenta un carrier o soporte compuesto por micelas de sialoglicoesfingolípidos, mezcla de sialoglicoesfingolípidos o glicoesfingolípidos modificados por sobre su concentración micelar crítica, en particular por micelas de gangliósidos, más particularmente por micelas de monosialogangliósidos y, de preferencia, por micelas de GM1, GM2 o mezclas de los mismos, que permiten incorporar en forma no-covalente drogas hidrofóbicas. En particular, la invención abarca las formulaciones que presentan un carrier o soporte compuesto por nano-micelas de gangliósidos, donde en particular el gangliósido es el GM1, que permiten incorporar en forma no-covalente drogas hidrofóbicas tales como el Ptx, el Dtx o la Anfotericina B, de forma tal que permite la aparición de un complejo altamente hidrosoluble, el cual además, puede ser selectivamente cubierto, en forma no-covalente, a través de una interacción hidrofóbica, con una proteína plasmática tal como la albúmina.

30

35

Por lo tanto, es un objeto de la invención una composición farmacéutica soluble en agua, que comprende al menos una sustancia terapéuticamente activa y al menos uno o más

40

compuestos seleccionados entre los sialoglicosfingolípidos, los glicosfingolípidos o una mezcla de sialoglicosfingolípidos y glicosfingolípidos, en donde al menos una de las sustancias terapéuticamente activas es una droga de características hidrofóbicas. En realizaciones particulares, dichas sustancias terapéuticamente activas se seleccionan entre las drogas antitumorales y las drogas antimicóticas. En otras, se seleccionan entre los antibióticos y las hormonas esteroideas.

Tal como se utilizan en la presente invención, los términos “sustancias terapéuticamente activas”, “drogas”, “principios activos”, “agentes activos” y “sustancias bioactivas”, deben entenderse como equivalentes.

De acuerdo con una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención es una composición adaptada para ser administrada a un paciente en forma inyectable. Más preferentemente aún, es una composición inyectable, estéril y translúcida. De manera particular, la composición farmacéutica soluble en agua de la invención puede liofilizarse o encontrarse en forma de liofilizado. En ese caso, la composición puede ser reconstituida con un solvente seleccionado entre agua destilada, solución salina (NaCl 0,9%), solución tampón de Fosfato salino (PBS), agua destilada conteniendo 5% de dextrosa y solución salina con 5% de dextrosa. Así, son también objetos particulares de la presente invención, una composición farmacéutica liofilizada, soluble en agua y estéril, que puede ser resuspendida de modo que las drogas antitumorales como Dtx o Ptx tengan una concentración final comprendida entre 0,1 y 10 mg/ml, de preferencia 0,1 y 6 mg/ml y más preferentemente aún entre 1 y 6 mg/ml.

De preferencia, la composición farmacéutica soluble en agua de la invención comprenderá, al menos, una sustancia terapéuticamente activa y uno o más glicosfingolípidos, siendo estos últimos preferentemente seleccionados entre los gangliósidos. Más preferentemente aún, entre los gangliósidos se prefiere a los monosialogangliósidos, los disialogangliósidos, los trisialogangliósidos o a una mezcla de los mismos. En una realización todavía más preferida, los monosialogangliósidos se seleccionan entre GM1, GM2 o una mezcla de los mismos, los disialogangliósidos se seleccionan entre GD1a, GD1b o una mezcla de los mismos y el trisialogangliósido es el GT1. Asimismo, las mezclas preferidas de gangliósidos se seleccionan entre una mezcla de monosialogangliósidos y disialogangliósidos, una mezcla de monosialogangliósidos y trisialogangliósidos, una mezcla de disialogangliósidos y trisialogangliósidos y una mezcla de monosialogangliósidos, disialogangliósidos y trisialogangliósidos.

Preferentemente, en la composición farmacéutica soluble en agua de la invención, la o las drogas con características hidrofóbicas se encuentran unidas a los gangliósidos en forma no covalente y los gangliósidos se encuentran formando nanomicelas. Más preferentemente aún,

el pH de las nanomicelas está comprendido en el rango de entre alrededor de 3 y alrededor de 7. En una realización todavía más preferida, el pH de las nanomicelas está comprendido en el rango de entre alrededor de 4 y alrededor de 6.

- 5 Particularmente, en las composiciones farmacéuticas solubles de la invención, las nanomicelas poseen un tamaño promedio menor que 200nm, más particularmente aún, menor que 100nm, de preferencia, entre alrededor de 10 nm y alrededor de 80 nm y, todavía más preferentemente, entre alrededor de 10 nm y alrededor de 50 nm.

Respecto de los gangliósidos, el GM1 es uno de los gangliósidos cuantitativamente más importantes presentes en el tejido nervioso. Los gangliósidos son moléculas anfipáticas, que
10 contienen una mitad lipofílica formada por esfingosina y un ácido graso como, por ejemplo, el ácido esteárico, y una mitad hidrofílica compuesta por carbohidratos que incluyen al menos entre uno y cuatro monosacáridos, y entre uno y tres moléculas de ácido siálico, que dan origen a los distintos gangliósidos que se conocen. Estos glicolípidos complejos son
15 reconocidos por ser ácidos, solubles en agua y pobremente dializables. Como los gangliósidos están mayormente asociados con membranas del tejido nervioso, se ha sugerido que podrían jugar un rol en la transferencia de información a través de estas membranas. (Ledeen R. W. y col., 1998, "Sphingolipids as signaling modulators in the nervous system". Annals of the New York Academy of Science Vol 845). En particular el monosialogangliósido
20 GM1, ha sido implicado en proceso de diferenciación neuronal en cerebelo de ratas (Willinger M. y Schachner M. , 1980, "GM1 ganglioside as a marker for neuronal differentiation in mouse cerebellum", Dev Biol.74(1):101-117) y también como receptor para la toxina colérica (Wu, G. y Leeden, 1988, "The ganglioside-GM1 is the specific receptor for the cholera toxin", Anal R.. Biochem., vol.173, p.368-375).

25 Los gangliósidos a ser utilizados en la presente invención pueden ser obtenidos a partir de animales que poseen estos lípidos. En particular, pueden ser obtenidos a partir del tejido nervioso de animales seleccionados entre un grupo de mamíferos y no-mamíferos tales como, felinos, bovinos, porcinos, equinos y peces.

30 Las micelas de gangliósidos de la presente invención resultan ser un componente versátil, capaz de solubilizar o asociar no sólo a aquellas moléculas o macromoléculas que son muy solubles en agua, sino también a aquellas que son insolubles. La micela es una asociación coloidal que presenta regiones con una marcada anisotropía y un gradiente decreciente de solubilidad acuosa que va desde el exterior al interior de la misma. Esta es una de las
35 propiedades que hace a la capacidad de las micelas para solubilizar un amplio rango de otros solutos.

Las micelas pueden solubilizar material orgánico insoluble, debido a su capacidad para incorporar dicho material en el dominio interior altamente hidrofóbico de la micela. En la parte más exterior de la cadena hidrocarbonada, los tres o cuatro átomos de carbono son todo-trans y, por lo tanto, resulta un dominio menos fluido. Esta región resulta, por lo tanto, débilmente hidrofóbica, por lo cual podría estar parcialmente hidratada. Por lo tanto, esto representa una zona de transición entre la región puramente hidrofóbica y la región puramente hidrofílica. Las moléculas que entran en esta región deben ser ligeramente compatibles con ambas, la región hidrofóbica de las cadenas lipídicas y la región solvatada de la cabeza polar y, por lo tanto, se deben comportar como moléculas anfipáticas. En el caso de principios activos de características hidrofóbicas, estos tienden a ubicarse directamente en la región profunda de la micela, a través de la interacción con las cadenas hidrofóbicas de los ácidos grasos.

Con respecto a la región de la cabeza polar de la micela, existe una variabilidad de composiciones, lo que significa la posibilidad de tener un rango de características de superficies diferentes en cada tipo de micelas que pueden ser utilizadas para anclar o asociar un rango de agentes activos. En el caso de este tipo de micelas iónicas, la región de la cabeza polar posee tiene la capacidad de unir gran cantidad de contraiones, por lo que se asemeja a una solución concentrada de electrolitos. Más aún, la doble capa iónica difusa, presente en las micelas cargadas, se extiende más allá de la denominada Stern layer y ocuparía una región o solución acuosa alrededor de la micela.

Las micelas poseen la capacidad de disolver agentes activos y forman un excelente sistema para la captación e incorporación de moléculas insolubles o parcialmente insolubles. Se ha propuesto que esta partición de moléculas estaría limitada a moléculas relativamente pequeñas, que puedan amoldarse en la estructura altamente anisotrópica de las cadenas de ácidos grasos, ya sea por ocupar la zona intermedia o por intercalarse entre las cadenas de los ácidos grasos. Así, las micelas pueden actuar como un agente activo para el transporte de drogas completamente o parcialmente insolubles en agua, dirigiéndolas directamente a la región de las cadenas hidrocarbonadas del ácido esteárico.

La presente invención describe una variada composición de micelas lipídicas conteniendo agentes bioactivos, los métodos para obtenerlas y el uso de las mismas. En un aspecto de la presente invención, se describe una serie de formulaciones micelares que pueden incorporar, por un lado, a los agentes bioactivos y, por otra parte, una solución tampón con un pH comprendido entre 3 y 7.

En una realización particular, la composición farmacéutica soluble en agua de la invención comprende alrededor de 1 parte de disialogangliósidos por cada alrededor de entre 5 y 15

partes de monosialogangliósidos. En otra, comprende alrededor de 1 parte de trisialogangliósidos por cada alrededor de entre 5 y 15 partes de monosialogangliósidos. En otra, comprende alrededor de 1 parte de trisialogangliósidos por cada alrededor de 10 partes de disialogangliósidos.

5

En otra realización particular, la composición farmacéutica soluble en agua de la invención comprende uno o más glicoesfingolípidos seleccionados entre los gangliósidos que contienen ácido fólico covalentemente unido al dominio glicosídico o los gangliósidos que contienen ácido fólico covalentemente unido al ácido siálico. De manera particular, los

10 gangliósidos que contienen ácido fólico covalentemente unido, representan entre alrededor del 0.5% y alrededor del 15% del total de los gangliósidos presentes en la composición.

15

En realizaciones preferidas de la invención, la composición farmacéutica soluble en agua comprende Paclitaxel (Ptx) o Docetaxel (Dtx). De preferencia, comprende Ptx o Dtx en una relación molar droga: gangliósido de entre alrededor de 1:10 y alrededor de 1:100. Más preferentemente aún, comprende entre alrededor de 0,1 mg/ml a alrededor de 6 mg/ml de Ptx o Dtx y entre alrededor de 4 mg/ml y alrededor de 300 mg/ml de gangliósidos. En otra

20 realización particular, la composición farmacéutica soluble en agua de la invención, comprende doxorubicina (Doxo) en una relación molar Doxo: gangliósido de entre alrededor de 1:1 y alrededor de 1:50. En otra realización particularmente preferida, la composición farmacéutica soluble en agua de la invención comprende Doxo y al menos una droga seleccionada entre Ptx y Dtx en una relación molar para cada una de las drogas, droga: gangliósido de entre alrededor de 1:10 y alrededor de 1:100.

25

En otra realización particular de la invención, la composición farmacéutica soluble en agua comprende anfotericina B, de preferencia, en una relación molar anfotericina B: gangliósido de entre alrededor de 2:1 y alrededor de 1:5 y, más preferentemente aún, en una relación molar anfotericina B: gangliósido de alrededor de 1:1. En otra realización preferida, comprende entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 10 mg/ml de anfotericina B y entre

30 alrededor de 0,18 mg/ml y alrededor de 10mg/ml de gangliósidos.

35

En una realización particularmente preferida de la invención, la composición farmacéutica soluble en agua comprende nanomicelas de gangliósidos cubiertas en forma no-covalente con albúmina sérica humana, albúmina sérica humana recombinante o con albúmina bovina, más preferentemente con albúmina sérica humana y, en particular, con albúmina sérica humana conteniendo ácidos grasos. Más particularmente aún, están cubiertas con albúmina sérica humana, con o sin ácidos grasos, en una relación de masa respecto de GM1 de 2:1.

En otra realización particular, la invención abarca una composición farmacéutica soluble en agua, en donde las nanomicelas de gangliósidos están cubiertas con albúmina que contiene ácido fólico covalentemente unido. Más particularmente aún, la cantidad de ácido fólico covalentemente unido a la albúmina representa entre el 1 y el 20% del total de la albúmina.

5

A modo de ejemplo, para su administración a un paciente, la composición farmacéutica soluble en agua de la invención podría ser inyectada en una bolsa plástica del tipo de las utilizadas para transfusión conteniendo albúmina humana, de manera de permitir, de esta manera, la unión de las nanomicelas de GM1-Ptx, GM1-Dtx, GM1-Ptx-Doxo, GM1-AmB a la albúmina.

10

Es de destacar que el procedimiento de carga de las micelas revelado en la presente, muestra una diferencia significativa respecto de los métodos generales para la carga de liposomas con agentes bioactivos mediante el uso de un potencial transmembrana a través de la bicapa lipídica de los liposomas, de acuerdo a lo que se describe, por ejemplo, en las patentes U.S. Pat. N° 5,171,578 y U.S Pat. N° 5,077,056.

15

Las formulaciones de la presente invención pueden ser preparadas mediante un método de carga pasivo. Por ejemplo, los agentes bioactivos pueden ser encapsulados en las nanomicelas de gangliósidos a altas concentraciones usando métodos tan simples como lo son la incubación a bajas o altas temperaturas, donde la incorporación ocurre en forma espontánea. Por otra parte, la cobertura de las micelas de GM1 con albúmina sérica humana ocurre en forma espontánea, no-covalente y mediante una interacción de tipo hidrofóbica, que termina produciendo ya sea un complejo ternario formado por GM1-droga-albúmina o bien generando, cuando la albumina tiene incorporado en forma covalente ácido fólico, un complejo cuaternario gm1-droga-albumina-fólico. El procedimiento puede ser resumido de la siguiente manera: se disuelve al monosialogangliósido GM1 en agua destilada mediante una suave agitación y luego se deja reposar a una temperatura entre 4 y 8 °C durante, al menos, 24hs. Se selecciona este tiempo para evitar la presencia de estructuras lipídicas de alto peso molecular que no pudieran ser filtradas mediante poro de 0,22 micras. Este tiempo de incubación permitiría una reorganización de las micelas de gangliósidos, lo que haría que las mismas adopten una estructura estabilizada, de tamaño menor que 200 nm. Luego, las nanomicelas de gangliósidos se incuban en presencia de un décimo de su volumen (1/10 vol/vol) con solventes tales como etanol o dimetilsulfóxido, conteniendo la droga tumoral hidrofóbica completamente soluble. Las muestras son incubadas a una temperatura de entre alrededor de 4 y alrededor de 8 °C durante, por lo menos, 4hs. Luego, el solvente orgánico se remueve de la preparación de las nanomicelas de gangliósidos mediante un proceso de diálisis. Esta diálisis se realiza frente una solución de grado farmacéutico de nivel inyectable, con el pH adecuado. La formulación de micelas con la droga incorporada, esencialmente

20

25

30

35

libre de solventes y con el pH deseado, se centrifuga entre 15.000 y 30.000xg durante 15 minutos, con el fin de remover, o precipitar, compuestos hidrofóbicos insolubles indeseables que no hubieran sido incorporados en las micelas.

- 5 La formulación acuosa transparente de nano-micelas de gangliósidos conteniendo las drogas antitumorales o antimicóticas, entrampadas o encapsuladas, es luego incubada en presencia de albúmina humana purificada, albúmina humana purificada conteniendo ácido fólico covalentemente unido, plasma humano total o suero humano total, de manera de asegurar la interacción de la albúmina con las micelas de GM1. Esta incubación se puede llevar a cabo a
- 10 37 °C durante 8hs, o bien a 55 °C durante 30 minutos. Las formulaciones compuestas por los complejos de GM1 y Ptx ó GM1-Ptx-Albúmina son finalmente liofilizadas.

Así, la presente también se refiere a un procedimiento para la obtención de micelas conteniendo al menos un agente hidrofóbico bioactivo nanoencapsulado, que comprende las

15 siguientes etapas:

- (a) solubilizar los gangliósidos en agua destilada o en una solución salina de un pH que oscile entre 3 y 7, siempre por sobre la concentración micelar crítica, dejando reposar la solución a
- 20 4 °C por al menos 24hs;
- (b) agregar sobre la solución de micelas de gangliósidos obtenida de acuerdo con la etapa anterior, alrededor de 10% de una solución de dimetilsulfóxido o etanol conteniendo el agente bioactivo seleccionado;
- 25 (c) incubar dicha mezcla a bajas temperaturas, entre 4 y 8 °C, o bien a alta temperatura entre 45 y 60 °C, por un tiempo suficiente, preferentemente comprendido entre alrededor de 1 y 4hs, de modo de asegurar la correcta incorporación del agente bioactivo en las micelas y luego;
- 30 (d) dializar la solución micelar conteniendo el principio bioactivo frente a una solución de agua destilada o una solución farmacéuticamente aceptable que tenga un pH comprendido entre 3 y 7, durante 24hs a una temperatura entre 4 y 8 °C, de manera de remover completamente el solvente orgánico;
- 35 (e) incubar las micelas formadas por el complejo GM1-droga en presencia de albúmina sérica humana durante una hora a una temperatura comprendida entre 45 y 60 °C, o bien durante 8hs a una temperatura de 37 °C, de manera de permitir la formación del complejo ternario GM1-droga-Albúmina;

(f) esterilizar la solución acuosa y transparente obtenida de la etapa anterior, la cual contiene el agente hidrofóbico bioactivo incorporado en la micela de GM1, mediante filtración por 0,1 o 0,2 micras;

5 (g) liofilizar las micelas esterilizadas y, finalmente,

h) resuspender las micelas liofilizadas en una solución farmacéuticamente aceptable de manera que puedan ser administradas en forma inyectable endovenosa para el tratamiento de la patología en cuestión.

10

La cantidad de los distintos agentes bioactivos incorporados (Ptx, Dtx, Doxo, AmB, etc.) en las nanomicelas de gangliósidos puede ser determinada utilizando técnicas espectroscópicas o bien técnicas cromatográficas adecuadas, tales como la cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

15

Las nanomicelas de gangliósidos pueden ser cargadas utilizando el solvente adecuado. En particular, pueden ser cargadas con el agente antitumoral, por ejemplo con Dtx o Ptx, previamente solubilizado en solventes orgánicos tales como, por ejemplo, etanol o dimetilsulfóxido. En realizaciones particulares, la cantidad de etanol o dimetilsulfóxido usada para incorporar docetaxel o paclitaxel en las nanomicelas de gangliósidos, se encuentra en el rango comprendido entre alrededor del 1 y alrededor del 15% del volumen total. Asimismo, pueden ser cargadas en un rango de temperaturas que va desde alrededor de 4 hasta alrededor de 60 °C.

20

Los solventes utilizados para cargar las nanomicelas y/o la sustancia terapéuticamente activa libre, pueden ser removidos mediante un procedimiento adaptado a tal fin. Por ejemplo, pueden ser removidos mediante diálisis o mediante filtración molecular por Sephadex G25.

25

Como se mencionó previamente, una o más drogas pueden ser cargadas en estas nanomicelas estables de monosialogangliósidos utilizando el método de incorporación pasiva mencionado más arriba. A modo de resumen, usando la composición de nanomicelas de la invención, es posible obtener una solución acuosa transparente para la mayoría de las drogas hidrofóbicas, las cuales tienden a particionar y estabilizarse en la región hidrofóbica de la micela de gangliósido compuesta por ceramida.

30

Otras drogas que se encuentran en la misma clase del Ptx, Dtx, Dox y Am-B y progesterona y que pueden ser incorporadas a las composiciones de la invención, son aquellas que son definidas por un coeficiente de partición aceite/agua, como una medida en una mezcla estándar de aceite/agua tal como octanol/agua, mas grande que 1, preferentemente mas

grande que 5. Las drogas representativas en esta categoría incluyen, prostaglandinas, dinitrato de isosorbide, testosterona, nitroglicerina, estradiol, vitamina E, cortisona, dexametasona y ésteres de la misma y valerato de betametasona.

5 Las micelas de gangliósidos muestran distintas capacidades para incorporar drogas en función de la estructura y su forma. En este sentido los resultados obtenidos por los inventores de la presente, muestran claramente que a medida que el tamaño de la cadena hidrofílica de oligosacáridos se achica, para pasar desde GM1 a GM2 y luego a GM3, se produce un cambio en la estructura de estos lípidos. Esto se traduce en que GM1 y GM2,
10 conservan una estructura de micelas, mientras que en GM3 ya no presenta una estructura micelar sino de vesícula. Estos cambios reflejan de forma paralela, una disminución de la incorporación de droga, siendo mayor para el GM1, menor para GM2 y sustancialmente menor para la estructura menos efectiva formada por GM3. (ver Figura 1)

15 Un estudio de microscopía electrónica, muestra que las micelas de GM1 de acuerdo con la invención, no son de forma esférica, sino de forma elipsoide. Los resultados obtenidos muestran que la asociación de la droga hidrofóbica con la micela produce un cambio en el tamaño de la micela. Este cambio, contrariamente a lo esperado, muestra que la incorporación de paclitaxel a la micela de GM1 para formar el complejo GM1-Ptx, produce
20 una disminución del peso molecular de la misma. (ver Figura 2)

Sin querer quedar atado a ninguna explicación en particular, este resultado podría ser explicado al menos por dos hipótesis: que existe una reducción en el número de monómeros de GM1 en las micelas, inducida por la presencia de la droga, o bien por un cambio en la
25 forma de la micela que cambie el número de monómeros, lo que podría hacer que dicha micela pase de un estado elipsoide a un estado esférico, generando un radio hidrodinámico menor, lo que finalmente se traduce en un menor peso molecular (PM).

Por otra parte, es ampliamente conocido que un factor que afecta las geometrías de las
30 micelas, está dado por el número de agregación, el cual a su vez, es dependiente de la estructura del monómero. En este estudio en particular, cuando las micelas de GM1 son formadas por monómero de GM1, en el cual el ácido esteárico fue removido y sustituido por el grupo fluoro-acetilo, se genera un nuevo compuesto denominado LIGA. Este nuevo tipo de micela de GM1, sufre un cambio en el número de agregación, pasando de tener unas 300
35 unidades a unas 100-120 unidades de GM1 (LIGA). Esto hace que se produzca una disminución en el tamaño de la micela, lo que a su vez se traduce en una marcada disminución en la incorporación de la droga. (ver Figura 3)

40 EJEMPLOS

Ejemplo 1Carga de paclitaxel en micelas de gangliósidos GM1

- Muestras de monosialogangliósido GM1 conteniendo 30, 100, 300 y 600 mg fueron disueltas en 2 ml de agua destilada a pH 5 ó en 2 ml de solución tampón de acético-acetato 20 mM de pH 5, con agitación suave hasta lograr una completa disolución. La solución se dejó reposar durante, al menos, 24hs a 4 u 8 °C. La solución transparente fue luego centrifugada a 50.000xg durante 15 minutos y el sobrenadante fue filtrado por poros de 0,22 micras.
- Una alícuota de 0.5 ml de cada concentración respectiva (15 mg/ml, 50 mg/ml, 150 mg/ml y 300 mg/ml) fueron incubadas con 50 microlitros de DMSO conteniendo una cantidad creciente de paclitaxel (Ptx) para alcanzar las siguientes relaciones de Ptx-GM1: 1/100, 1/50, 1/25, 1/20, 1/15, 1/10 y 1/5. Las soluciones fueron incubadas a 4°C por una hora y luego centrifugadas a 15,000xg durante 15 min para remover el material de Ptx insoluble que no hubiese sido encapsulado en las micelas de GM1. Finalmente, para remover todo el DMSO, las muestras fueron dializadas frente a agua destilada o a solución de acético-acetato 20 mM a pH 5, durante 24hs.

- La cuantificación de Ptx incorporada en las micelas de GM1 se llevo a cabo mediante el uso de HPLC. En la Figura 4 se puede observar que el porcentaje de Ptx que permanece soluble asociado a GM1 es prácticamente constante desde la relación 1/100 hasta la 1/25, en donde la cantidad de Ptx incorporado representa el 95% del total de Ptx agregado al medio. A relaciones crecientes de 1/25 hasta la 1/5 se observa una disminución en la cantidad de Ptx soluble asociado a GM1 que va desde 90 %, 60%, 30% y 10% respectivamente.

Ejemplo 2Efecto de la temperatura sobre la carga de Ptx en micelas de GM1

- Ptx es cargado en las micelas de gangliósidos en relaciones 1/10, 1/15, 1/20 y 1/25 de la manera en la que se revela en el ejemplo 1, pero cada carga se realiza durante 30 minutos a una temperatura de:

- 1) A- 0 °C (Control),
- 2) B- GM1 precalentado a 55 °C y carga de Ptx a 0 °C,
- 3) C- GM1 precalentado a 55 °C y carga de Ptx a 25 °C,
- 4) D- GM1 precalentado y cargado a 55 °C.

Después de la incubación, las muestras fueron centrifugadas a 15.000xg durante 15 minutos y dializadas frente a agua destilada durante 24hs a 4°C. Finalmente, la cantidad de Ptx

incorporada en forma soluble en la micela de GM1 fue cuantificada por HPLC. En la Figura 5 se ve que en la relación 1/25, el cambio en la temperatura a la que se carga el Ptx no produce un incremento significativo en la incorporación del mismo, siendo la carga en todas las condiciones superior al 90%. Sin embargo, en las demás relaciones, se observa un
5 incremento marcado en la carga de Ptx, del orden de un 40%, cuando la misma se realiza a 55 °C comparada con la carga a 0 °C.

Ejemplo 3

10 Estudio comparativo “in vitro” de GM1-Ptx versus Ptx sobre células tumorales y no-tumorales en cultivo.

Diferentes líneas celulares, tumorales como HEP-2 y Hela, y no-tumorales como VERO y MA, fueron incubadas en medio MEM conteniendo 2% suero fetal bovino (Natocor-Villa Carlos
15 Paz- Córdoba – Argentina) en una estufa de CO₂ con 5% de CO₂, hasta confluencia. Sobre estos cultivos, se agregaron diferentes concentraciones de:

- a)- Ptx en DMSO, como control positivo
- b)- micelas de GM1-Ptx 25/1
- c)- micelas de GM1 en igual concentración que en b), a modo de control del efecto del GM1
20 per se, y
- d)- micelas del complejo GM1-Ptx-albúmina.

La viabilidad celular se evaluó utilizando la marcación con MTT luego de 24hs de
25 incubación.

Las Figuras 6 y 7, muestran que el GM1 aislado, no presenta ningún efecto sobre ningún tipo celular mientras que el Ptx en DMSO y la formulación GM1-Ptx producen una muerte completa en 24hs hasta una concentración de 10ng/ml sobre células tumorales y hasta 100ng/ml en las no-tumorales. Cuando la formulación tiene el complejo ternario GM1-Ptx-
30 Albúmina, para alcanzar el mismo efecto, se necesita un concentración de 20ng/ml sobre las células tumorales y de 200ng/ml sobre las no-tumorales.

Ejemplo 4

35 Incorporación de Doxorrubicina sobre micelas de GM1 o micelas de GM1-Ptx

Una masa de monosialogangliósido GM1 purificado (10, 30, 150, 300 y 600 mg) fue solubilizada, mediante agitación suave, en 2 ml de agua destilada (pH 5) o en solución tampón de acético-acetato 20 mM a pH 5, hasta su disolución completa. La solución se dejó
40 reposar durante, al menos, 24hs a una temperatura de entre 4 y 8 °C. La solución se

centrifugó a 50.000xg durante 15 minutos y el sobrenadante se filtró por 0,22µm. Con esta preparación se realizan dos ensayos de carga de Doxorubicina :

a) Doxorubicina con GM1 y

5 b) Doxorubicina sobre el complejo Ptx-GM1.

Para el punto a), una alícuota de 0,5 ml de cada preparación conteniendo 15mg/ml, 75mg/ml, 150mg/ml y 300mg/ml, se incubaron con 50µl de una solución de Doxorubicina de modo de alcanzar una relación molar del complejo Dox-GM1 de 1/15; 1/10; 1/5; 1/ 2.5 y
10 1/1. Las soluciones se incubaron nuevamente a 4°C durante una hora y luego se centrifugaron a 15.000xg durante 15 minutos, para remover posibles agregados insolubles. Finalmente, las muestras fueron dializadas durante 24hs a 4°C, de manera de remover la posible Doxorubicina libre.

15 Para el punto b), las micelas de GM1 se cargaron previamente con Ptx de manera de alcanzar la relación molar Ptx-GM1 1/25 y luego se llevó a cabo el ensayo que se describe en el punto a). La cuantificación de la Doxorubicina incorporada en la micela de GM1, se llevó a cabo mediante espectrofotometría a 492nm. En la Figura 8, se observa que el porcentaje de Doxo unida a GM1 y Ptx-GM1 incrementa desde la relación 1/15 hasta llegar a un máximo a la
20 relación 1/5.

Ejemplo 5

Incorporación de albúmina sobre micelas de GM1 y GM1-Ptx

25 Se prepararon Micelas de GM1 y de GM1-Ptx, conteniendo 5mg/ml de GM1, y una relación molar de Ptx-GM1 1/25, tal como se describió en los ejemplos anteriores. Estas micelas fueron incubadas en presencia de cantidades crecientes de albúmina sérica humana purificada (Laboratorio de Hemoderivados dependiente de la Universidad Nacional de Córdoba) de manera de alcanzar las siguientes concentraciones: 0.83, 1.67, 5, 15 y 30mg/ml
30 de concentración final. Las incubaciones fueron hechas a 37 °C durante 3 horas.

Como se muestra en las Figuras 9 y 10, cuando se incuban las micelas de GM1 y de GM1-Ptx con albúmina a 37 °C, se observa que, como consecuencia de la asociación, aparecen tres poblaciones de distinto peso molecular (PM), compuestas por GM1, Alb y Ptx. Una de ellas
35 tiene un PM que oscila alrededor de 600-700 kDa y que aumenta progresivamente con la concentración de albúmina, otra tiene un PM de 500-550kDa y la última un PM de 180-190kDa.

Por otra parte, también se realizaron incubaciones de micelas de Ptx-GM1:1/25 con GM1 5 mg/ml y Albúmina 5 mg/ml, a tres temperaturas: 4, 37 y 55 °C, durante periodos de tiempo que oscilaron entre 1 y 24 horas.

- 5 Como se observa en las Figuras 11, 12 y 13, correspondientes a incubaciones con albúmina a 4, 37 y 55 °C respectivamente, en las tres temperaturas estudiadas existe una interacción del complejo Ptx-GM1 con la albúmina agregada al medio. Esta interacción alcanza su grado máximo con mayor rapidez a mayores temperaturas.

10 Ejemplo 6

Incorporación de anfotericina B (AmB) sobre micelas de GM1. Análisis espectral de la formación del complejo

Un volumen de 0,9 ml de H₂O conteniendo diferentes concentraciones de GM1, fueron
15 incubados con 0,1 ml de AmB en DMSO (40mg/ml), de modo de obtener una relación molar final de GM1 a AmB de 1/5, 1/1, 5/1 y 25/1. Las muestras fueron incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego dializadas durante 24hs a 4°C. Finalmente, la solución resultante fue centrifugada a 15.000 x g durante 15 min, de manera de remover posibles agregados insolubles. Luego, se tomó una alícuota de la solución y se la diluyó 200
20 veces en etanol, determinándose la cantidad de AmB incorporada en las micelas de GM1 mediante medición de la densidad óptica a 410nm, comparándola con una curva testigo de AmB procesada en las mismas condiciones.

Por otra parte, la presencia del estado monomérico o de estados agregados de AmB fueron
25 evaluados mediante análisis espectral desde 300 a 500 nm; para ello, la dilución se realizó en H₂O para no modificar el estado de agregación. [ver Figura 14]. Cuando la concentración de AmB incrementa en cada relación evaluada, ocurre un cambio en la intensidad de los picos. Este comportamiento puede ser explicado por la existencia de dos estados espectrales mayoritarios de AmB: una forma monomérica que absorbe en 365, 385 y 410 nm y una forma
30 agregada de AmB que presenta un máximo de absorción a 345nm.

Ejemplo 7

Inhibición del crecimiento de *Candida Albicans* por la acción de micelas cargadas con Anfotericina B

Se prepararon micelas de GM1-AmB , con relaciones molares comprendidas entre 1:5, 1:2,5,
1:1 y 2,5:1, usando una concentración fija de AmB de 16ug/ml. Por otra parte, se prepararon los controles de micelas de GM1 y AmB. Un volumen de 100ul de las diferentes preparaciones
40 de GM1-AmB y sus respectivos controles, se incubaron en presencia de 900ul de una solución de *Candida Albicans* a una concentración de 1×10^5 células/ml, en una placa de 96 pocillos

por 24hs a 37°C. Se hicieron diluciones seriadas en la placa hasta alcanzar una concentración final de AmB de 0.0625ug/ml. Finalizada la incubación, la turbidez de la solución, que representa el crecimiento del microorganismo, fue evaluada por espectrofotometría a 610nm. La Figura 15, muestra que el complejo GM1-AmB a una relación 1:5 produce una inhibición del crecimiento celular igual al que se observa con el control de AmB. Por otra parte, las relaciones 1:2.5 y 1:1 producen una inhibición del crecimiento apenas un poco más bajo que la del control. La relación 2.5/1 del complejo GM1-AmB produce una muy baja inhibición del crecimiento celular.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1- Una composición farmacéutica soluble en agua, caracterizada porque comprende al menos una sustancia terapéuticamente activa y al menos un compuesto seleccionado entre los sialoglicosfingolípidos, los glicosfingolípidos o una mezcla de sialoglicosfingolípidos y glicosfingolípidos, en donde al menos una de las sustancias terapéuticamente activas es una droga de características hidrofóbicas.
- 10 2- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizada porque dicha droga con características hidrofóbicas es una droga seleccionada entre las drogas antitumorales y las drogas antimicóticas.
- 15 3- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizada porque es una composición inyectable.
- 4- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizada porque es una composición inyectable estéril y translúcida.
- 20 5- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizada porque el o los glicosfingolípidos se seleccionan entre los gangliósidos.
- 25 6- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizada porque los gangliósidos se seleccionan entre los monosialogangliósidos, los disialogangliósidos, los trisialogangliósidos o una mezcla de los mismos.
- 30 7- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizada porque los monosialogangliósidos se seleccionan entre GM1, GM2 o una mezcla de los mismos.
- 35 8- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque los disialogangliósidos se seleccionan entre GD1a, GD1b o una mezcla de los mismos.
- 9- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque el trisialogangliósido es el GT1.

40

- 10- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque comprende una mezcla de monosialogangliósidos y disialogangliósidos.
- 5 11- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque comprende una mezcla de monosialogangliósidos y trisialogangliósidos.
- 10 12- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque comprende una mezcla de disialogangliósidos y trisialogangliósidos.
- 15 13- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque comprende una mezcla de monosialogangliósidos, disialogangliósidos y trisialogangliósidos.
- 20 14- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizada porque comprende alrededor de 1 parte de disialogangliósidos por cada alrededor de entre 5 y 15 partes de monosialogangliósidos.
- 25 15- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizada porque comprende alrededor de 1 parte de trisialogangliósidos por cada alrededor de entre 5 y 15 partes de monosialogangliósidos.
- 30 16- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizada porque comprende alrededor de 1 parte de trisialogangliósidos por cada alrededor de 10 partes de disialogangliósidos.
- 35 17- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizada porque comprende uno o más glicosfingolípidos seleccionados entre los gangliósidos que contienen ácido fólico covalentemente unido al dominio glicosídico o los gangliósidos que contienen ácido fólico covalentemente unido al ácido siálico.
- 18- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizada porque los gangliósidos que contienen ácido fólico covalentemente unido, representan entre alrededor del 0.5% y alrededor del 15 % del total de los gangliósidos presentes en la composición.

- 19- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la composición de gangliósidos comprende un porcentaje de entre el 1 % y el 25 % de fosfatidil etanolamina covalentemente unida con polietilenglicol.
- 5
- 20- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada porque la droga o las drogas con características hidrofóbicas se encuentran unidas a los gangliósidos en forma no covalente y porque los gangliósidos se encuentran formando nanomicelas.
- 10
- 21- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizada porque comprende paclitaxel en una relación molar paclitaxel: gangliósido de entre alrededor de 1:10 y alrededor de 1:100.
- 15
- 22- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación 20, caracterizada porque comprende docetaxel en una relación molar docetaxel: gangliósido de entre alrededor de 1:10 y alrededor de 1:100.
- 20
- 23- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 ó 22, caracterizada porque comprende entre alrededor de 0,1 mg/ml a alrededor de 6 mg/ml de paclitaxel o docetaxel y entre alrededor de 4 mg/ml y alrededor de 300 mg/ml de gangliósidos.
- 25
- 24- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, caracterizada porque el pH de las nanomicelas está comprendido en el rango de entre alrededor de 3 y alrededor de 7.
- 30
- 25- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizada porque el pH de las nanomicelas está comprendido en el rango de entre alrededor de 4 y alrededor de 6.
- 35
- 26- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25, caracterizada porque las nanomicelas poseen un tamaño promedio menor que 100 nm.
- 27- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizada porque las nanomicelas poseen un tamaño promedio de entre alrededor de 20 nm y alrededor de 60 nm.

- 28- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación 20, caracterizada porque comprende doxorubicina en una relación molar doxorubicina: gangliósido de entre alrededor de 1:1 y alrededor de 1:50.
- 5 29- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación 20, caracterizada porque comprende doxorubicina y al menos una droga seleccionada entre paclitaxel y docetaxel en una relación molar para cada una de las drogas, droga: gangliósido de entre alrededor de 1:10 y alrededor de 1:100.
- 10 30- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo la reivindicación anterior, caracterizada porque el pH de las nanomicelas está comprendido en el rango de entre alrededor de 3 y alrededor de 7.
- 15 31- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizada porque el pH de las nanomicelas está comprendido en el rango de entre alrededor de 4 y alrededor de 6.
- 20 32- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación 20, caracterizada porque comprende anfotericina B en una relación molar anfotericina B: gangliósido de entre alrededor de 2:1 y alrededor de 1:5.
- 25 33- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizada porque comprende anfotericina B en una relación molar anfotericina B: gangliósido de alrededor de 1:1.
- 30 34- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizada porque comprende entre alrededor de 0,1 mg/ml y alrededor de 10 mg/ml de anfotericina B y entre alrededor de 0,18 mg/ml y alrededor de 10 mg/ml de gangliósidos.
- 35 35- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizada porque las nanomicelas poseen un tamaño promedio menor que 200nm.
- 36- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 35, caracterizada porque las nanomicelas poseen un tamaño promedio de entre alrededor de 20 nm y alrededor de 80 nm.

- 37- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 36, caracterizada porque el pH de las nanomicelas está comprendido en el rango de entre alrededor de 3 y alrededor de 7.
- 5 38- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 37, caracterizada porque el pH de las nanomicelas está comprendido en el rango de entre alrededor de 4 y alrededor de 5.
- 10 39- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 38, caracterizada porque las nanomicelas de gangliósidos están cubiertas en forma no-covalente con albúmina sérica humana, albúmina sérica humana recombinante o con albúmina bovina.
- 15 40- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizada porque las nanomicelas de gangliósidos están cubiertas en forma no-covalente con albúmina sérica humana.
- 20 41- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizada porque las nanomicelas de gangliósidos están cubiertas en forma no-covalente con albúmina sérica humana conteniendo ácidos grasos.
- 25 42- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 40 ó 41, caracterizada porque las nanomicelas de gangliósidos están cubiertas con albúmina sérica humana con o sin ácidos grasos en una relación de masa respecto de GM1 de 2:1.
- 30 43- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación 39, caracterizada porque las nanomicelas de gangliósidos están cubiertas con albúmina que contiene ácido fólico covalentemente unido.
- 35 44- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizada porque la cantidad de ácido fólico covalentemente unido a la albúmina representa entre el 1 y el 20% del total de la albúmina.
- 45- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque es una composición que se encuentra en forma de liofilizado.

46-Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizada porque se reconstituye con un solvente seleccionado entre agua destilada, solución salina (NaCl 0,9%), solución tampón de Fosfato salino (PBS), agua destilada conteniendo 5% de dextrosa y solución salina con 5% de dextrosa.

5

47- Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación 7, 21, 22, 29 ó 32, caracterizada porque previo a ser inyectada al paciente, se la inyecta en una bolsa plástica conteniendo albúmina humana y un solvente adecuado, de manera de permitir la unión de las nanomicelas de GM1-Paclitaxel, GM1-Docetaxel, GM1-Paclitaxel-Doxorrubicina, GM1-Anfotericina B a la albúmina.

10

48-Una composición farmacéutica soluble en agua, de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque la droga con características hidrofóbicas se selecciona entre las prostaglandinas, el dinitrato de isosorbide, la testosterona, la nitroglicerina, el estradiol, la vitamina E, la cortisona, la dexametasona y sus ésteres y el valerato de betametasona.

15

49- Un procedimiento para la obtención de micelas conteniendo al menos una sustancia terapéuticamente activa nanoencapsulada, caracterizado porque comprende:

20

(a) solubilizar los gangliósidos en agua destilada o en una solución salina de un pH que oscile entre 3 y 7, siempre por sobre la concentración micelar crítica, y dejar reposar la solución;

(b) sobre la solución de micelas de gangliósidos obtenida de acuerdo con la etapa anterior, agregar alrededor de 10% de una solución de dimetilsulfóxido o etanol conteniendo la sustancia terapéuticamente activa seleccionada;

25

(c) incubar dicha mezcla de manera de asegurar la correcta incorporación de la sustancia terapéuticamente activa en las micelas;

30

(d) dializar la solución micelar conteniendo la sustancia terapéuticamente activa frente a una solución de agua destilada o una solución farmacéuticamente aceptable que tenga un pH comprendido entre 3 y 7, de manera de remover completamente el solvente orgánico;

(e) incubar las micelas formadas por el complejo GM1-sustancia terapéuticamente activa en presencia de albúmina sérica humana, de manera de permitir la formación del complejo ternario GM1-sustancia terapéuticamente activa -Albúmina;

35

(f) esterilizar la solución acuosa y transparente obtenida de la etapa anterior, la cual contiene a la sustancia terapéuticamente activa incorporada en la micela de GM1, mediante filtración;

(g) liofilizar las micelas esterilizadas y, finalmente,

5 h) resuspender las micelas liofilizadas en una solución farmacéuticamente aceptable.

10

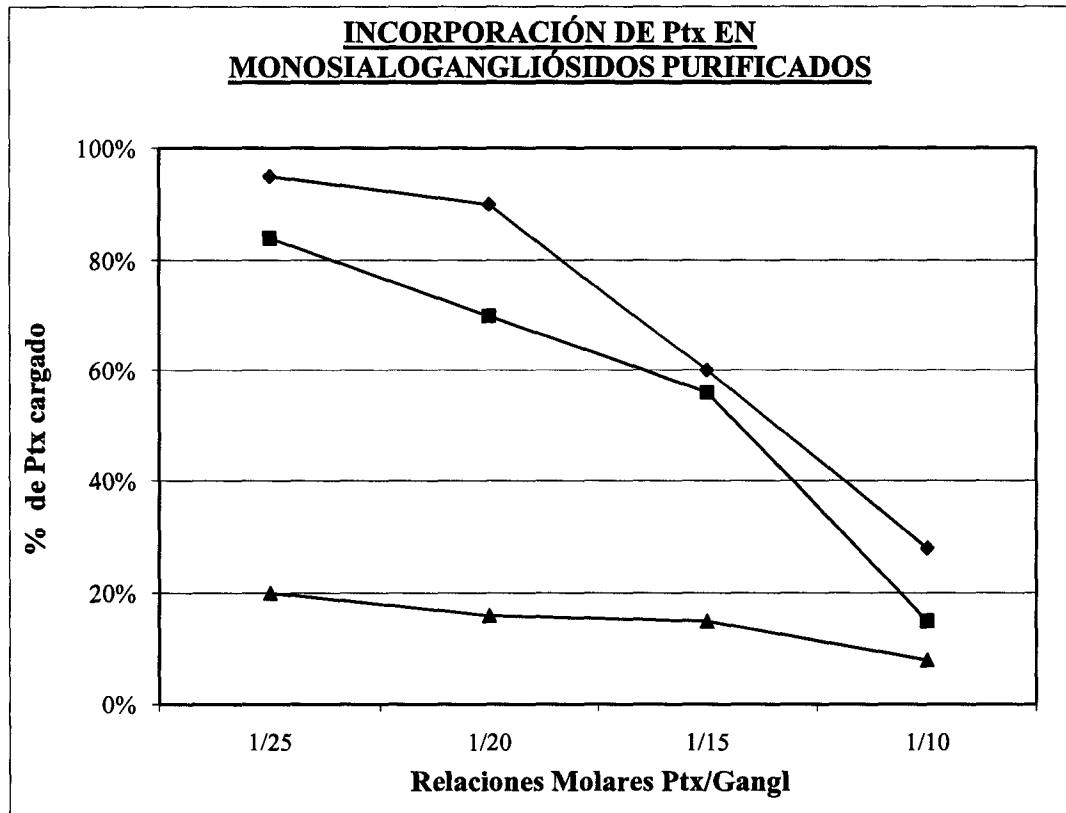


FIGURA 1

PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LA INTERACCIÓN ENTRE GMI Y Ptx

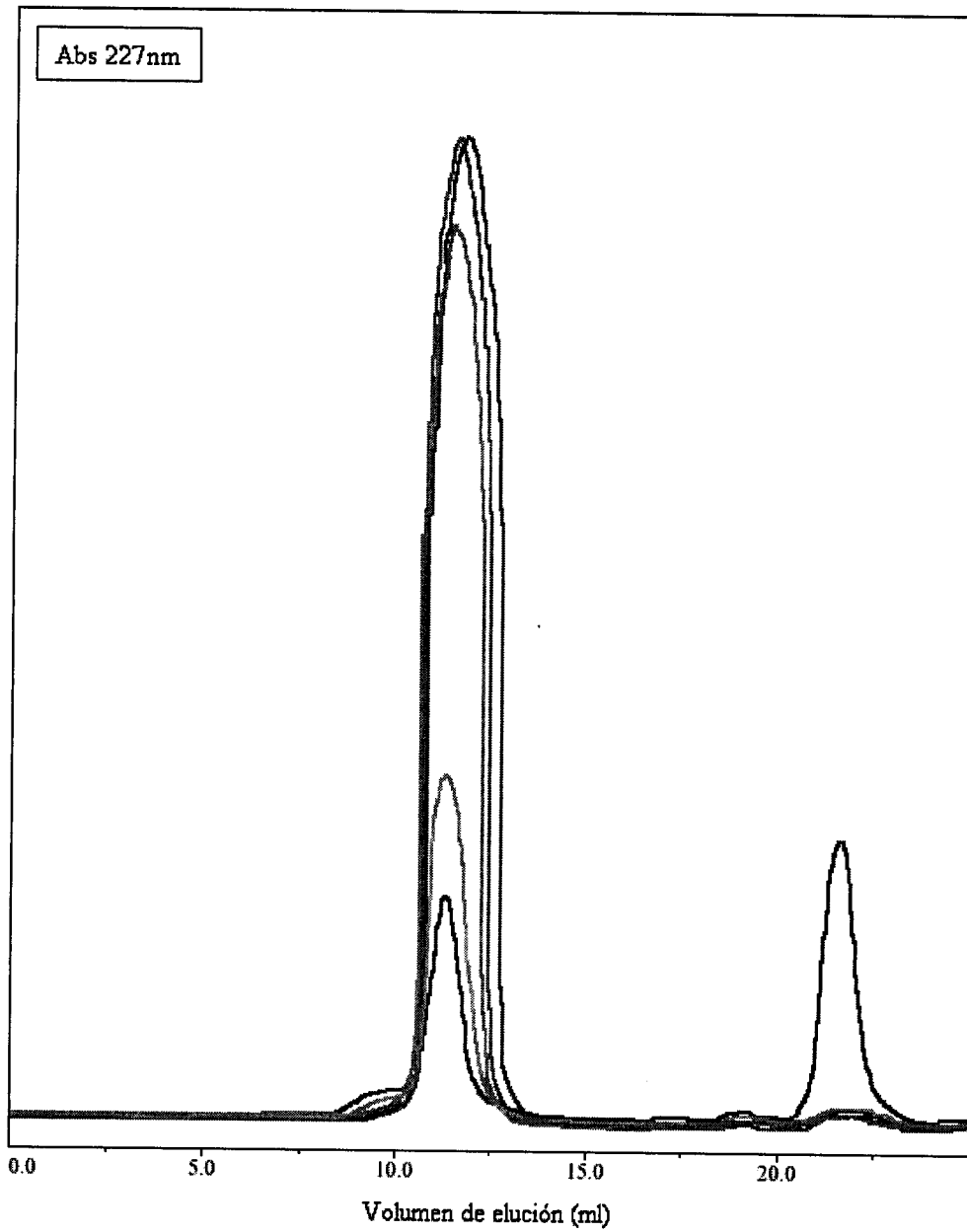


FIGURA 2

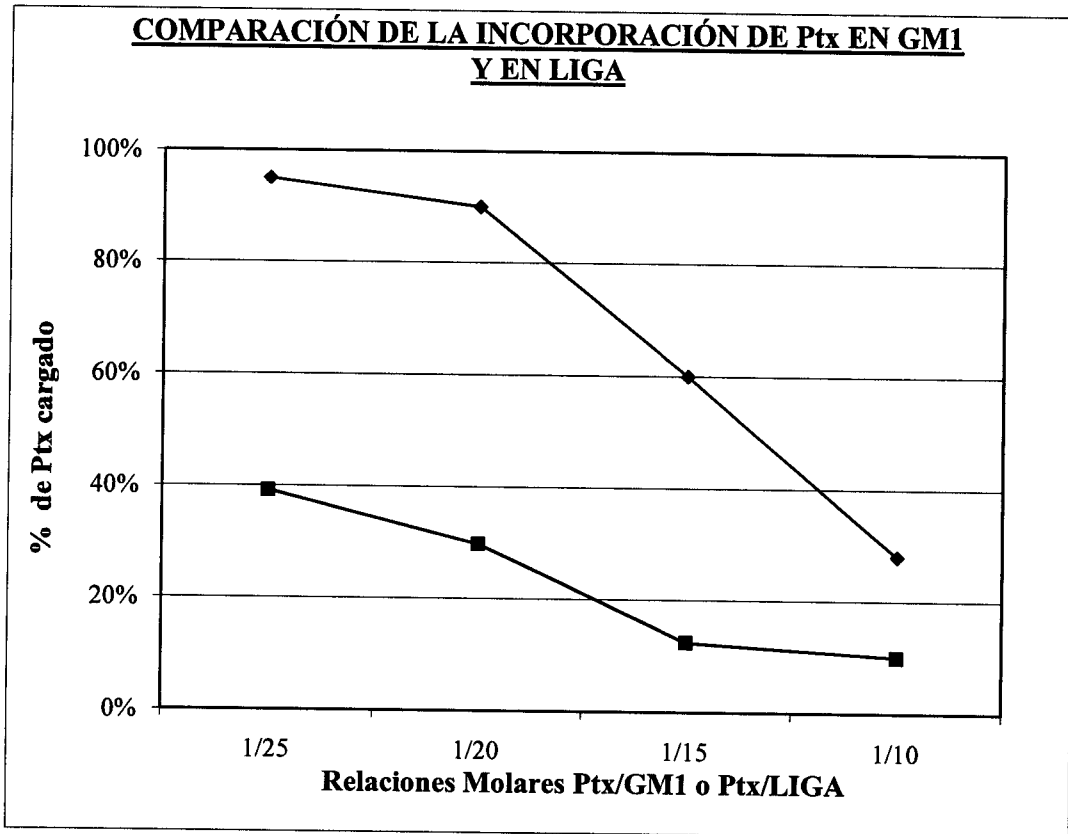


FIGURA 3

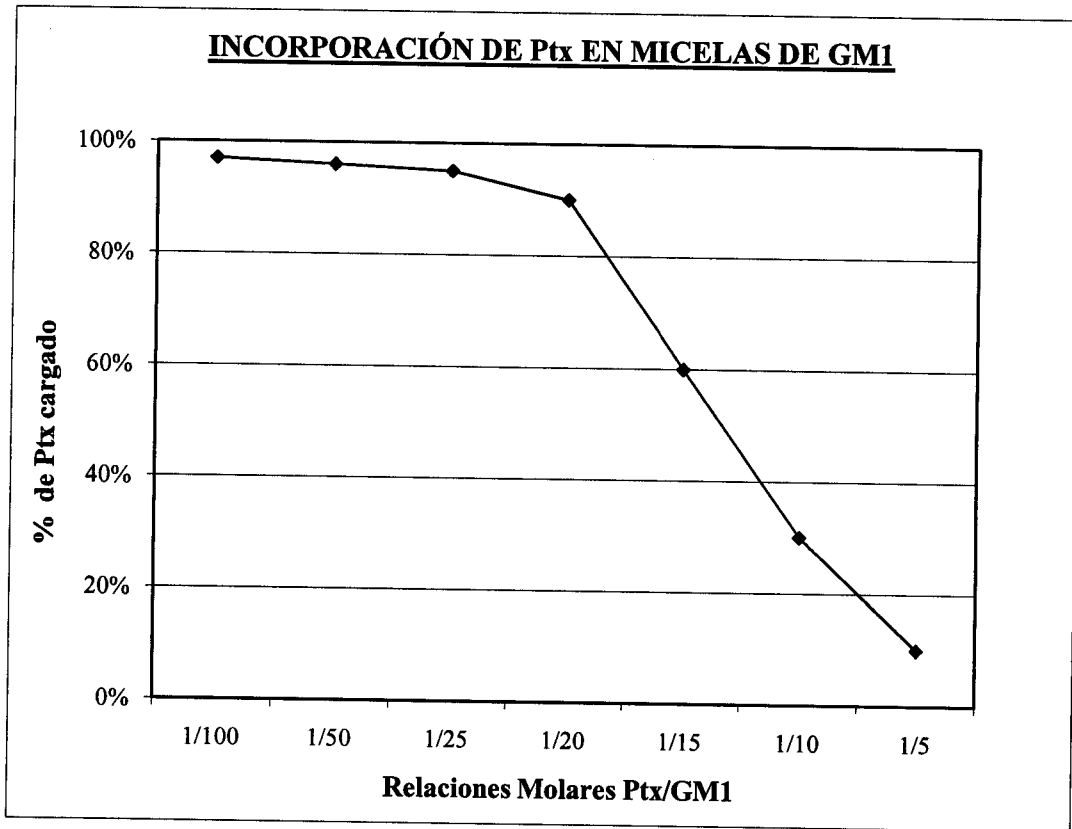


FIGURA 4

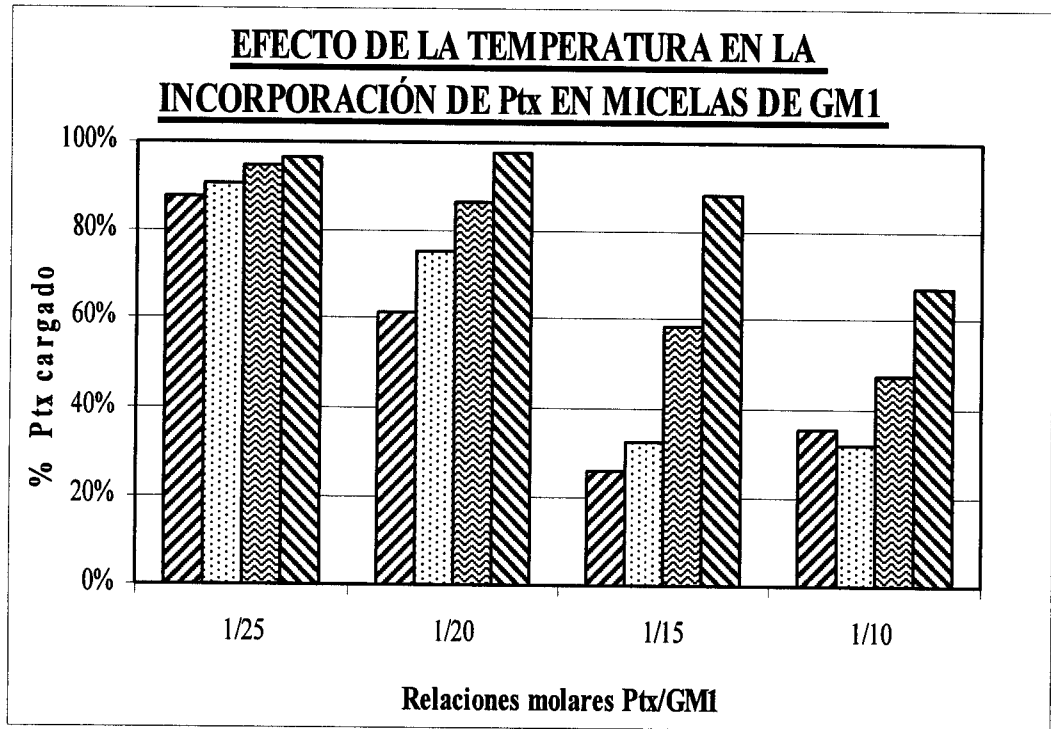


FIGURA 5

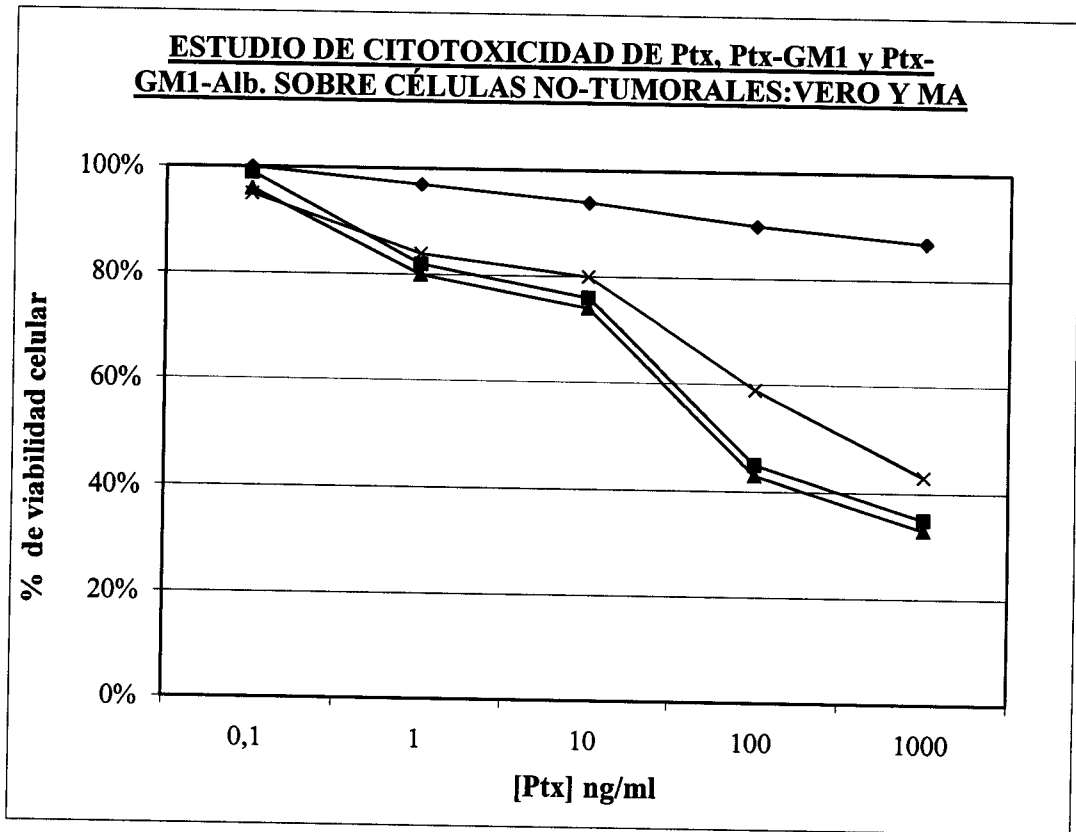


FIGURA 6

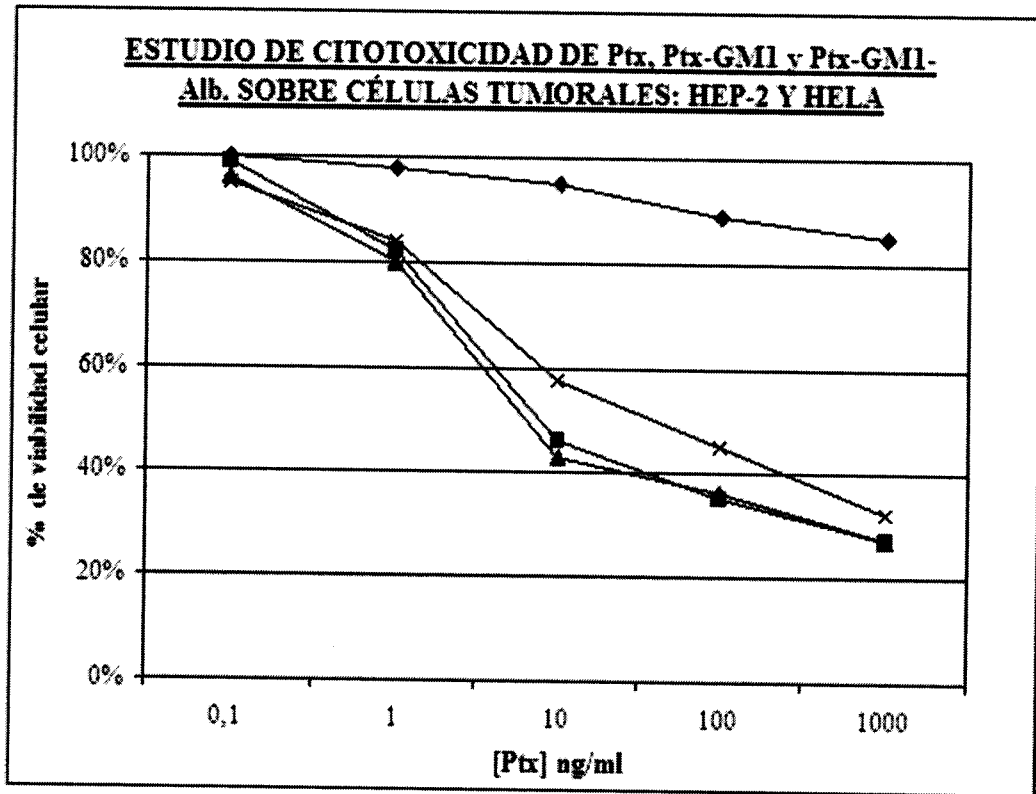


FIGURA 7

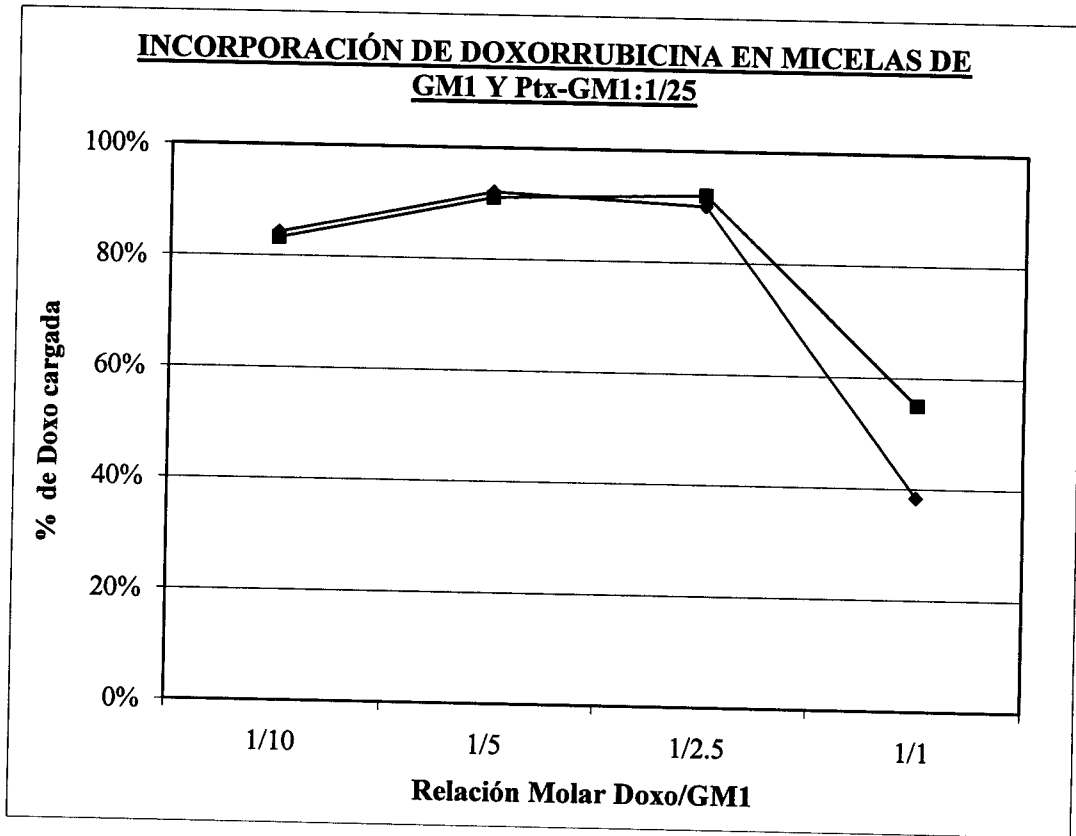


FIGURA 8

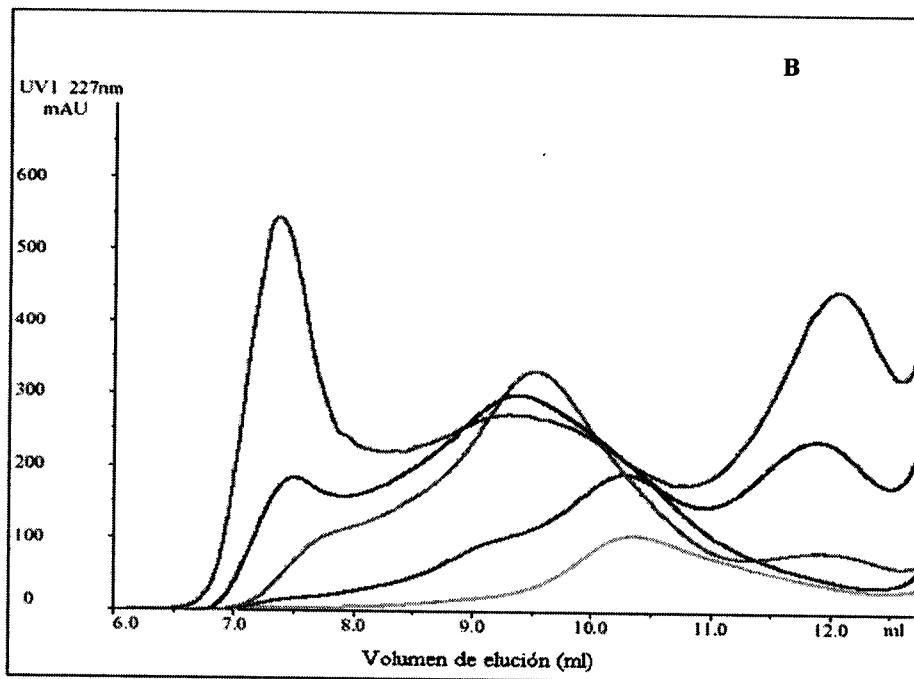
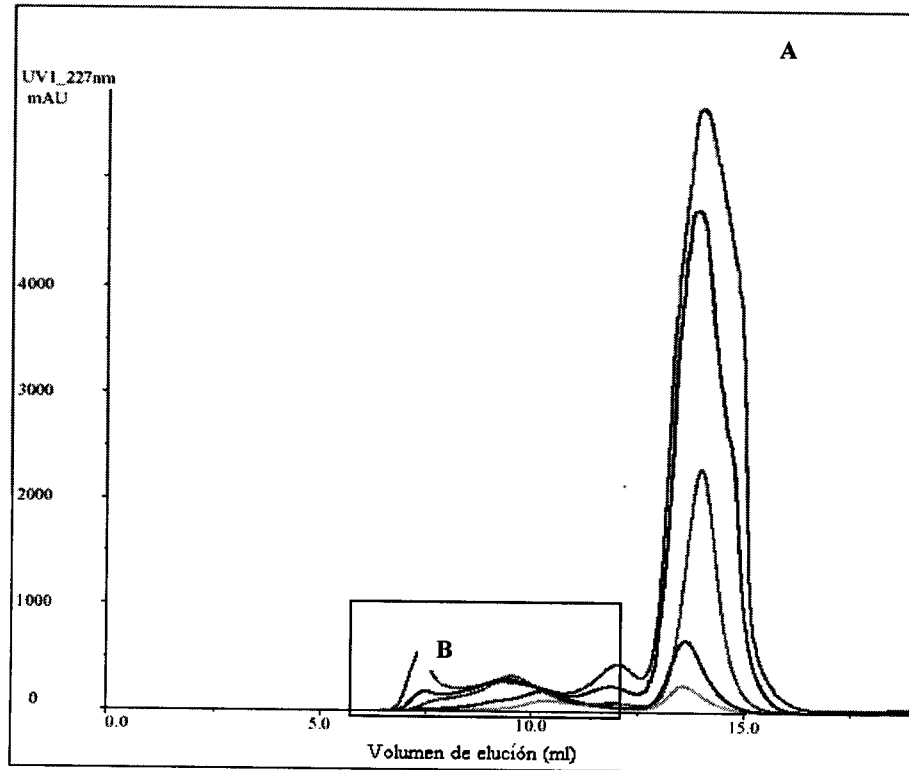


FIGURA 9

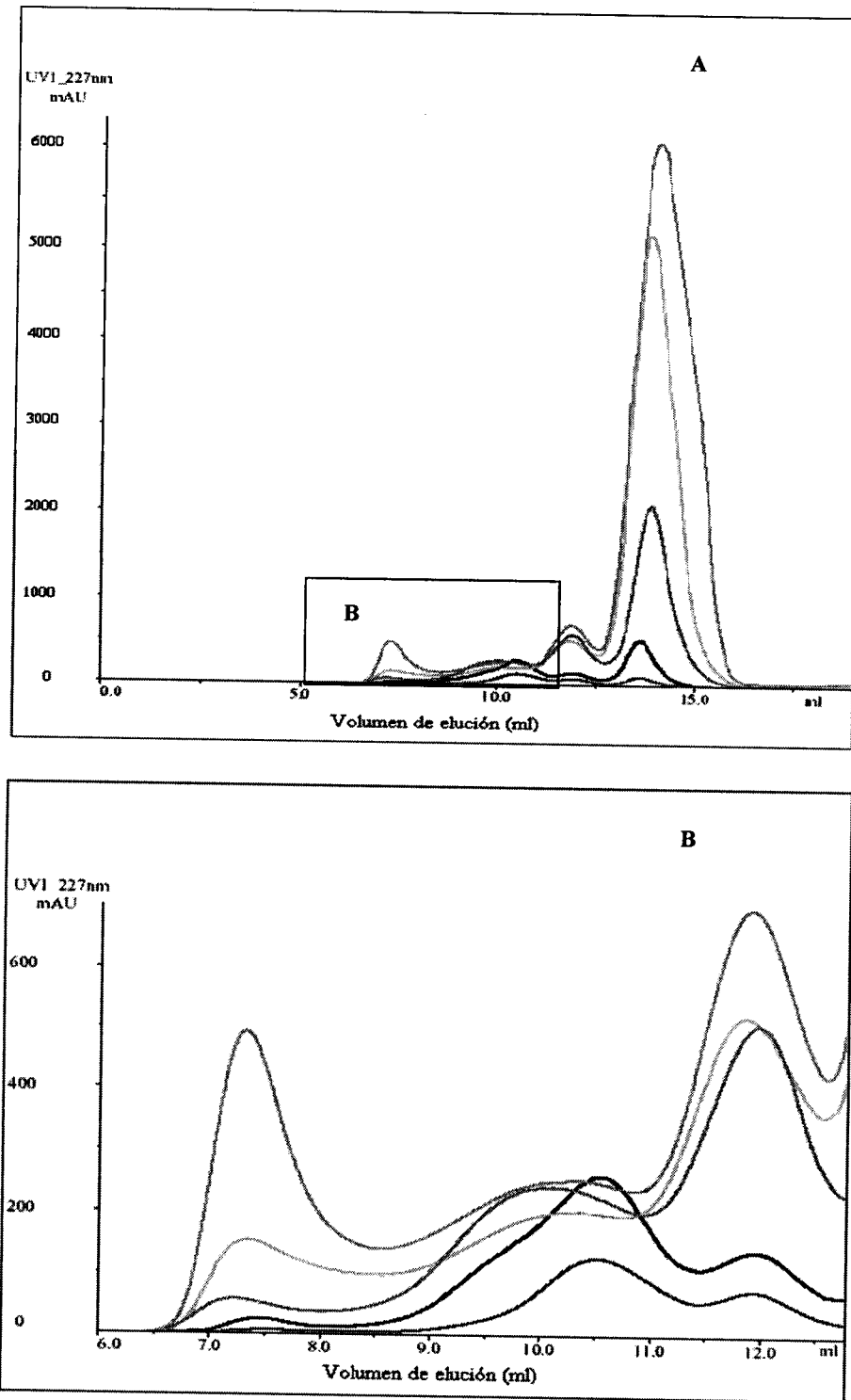


FIGURA 10

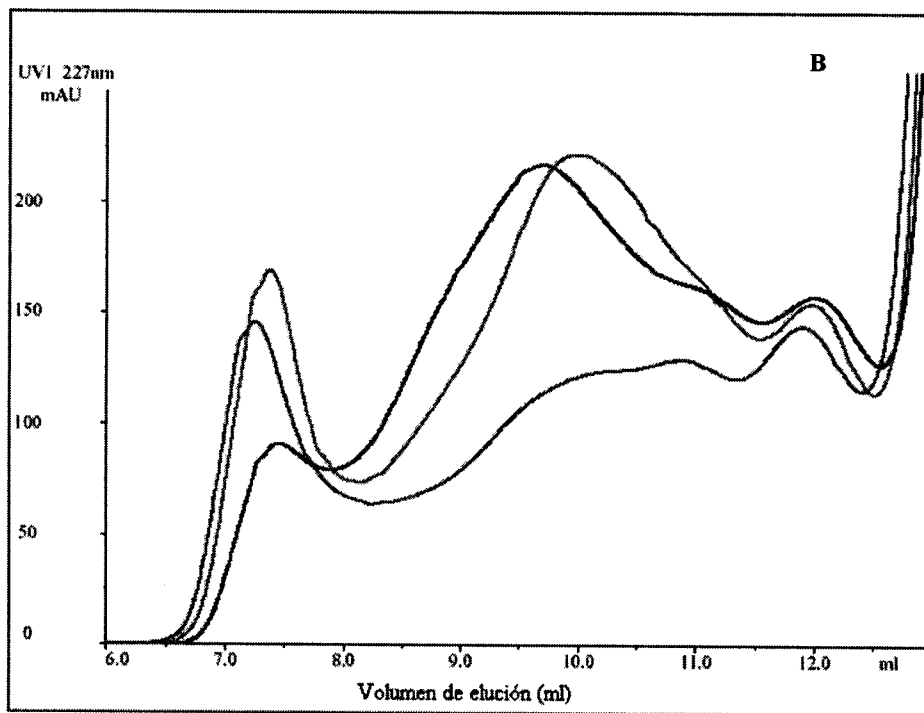
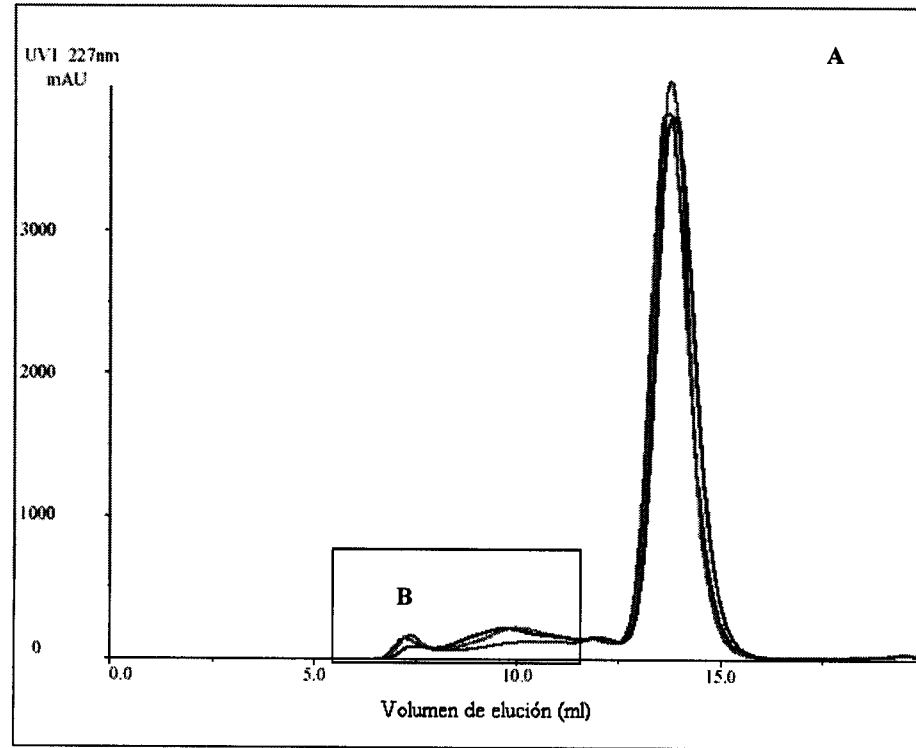


FIGURA 11

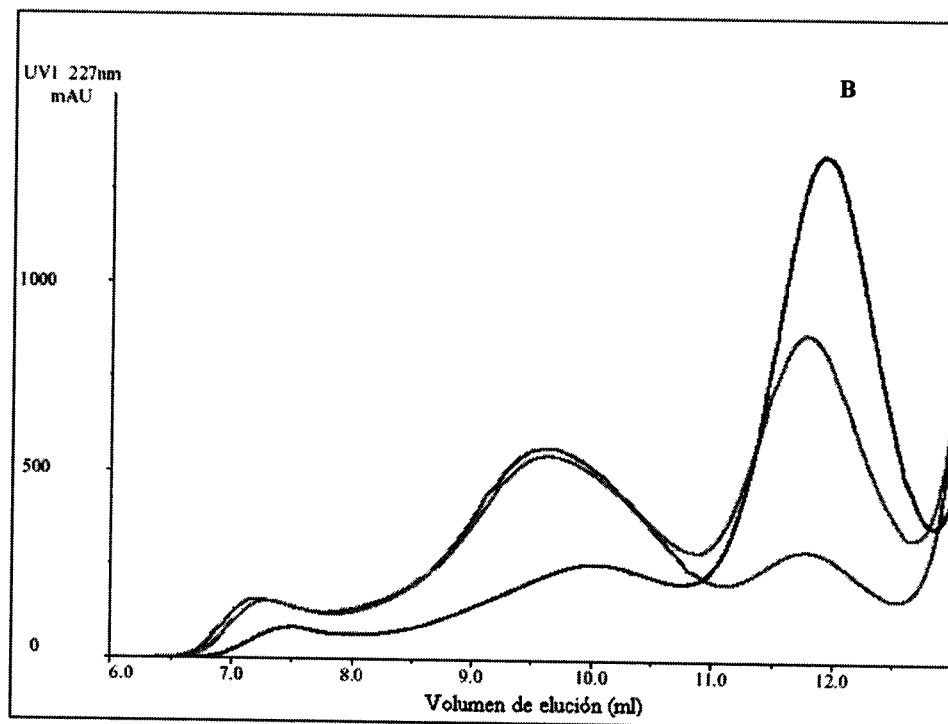
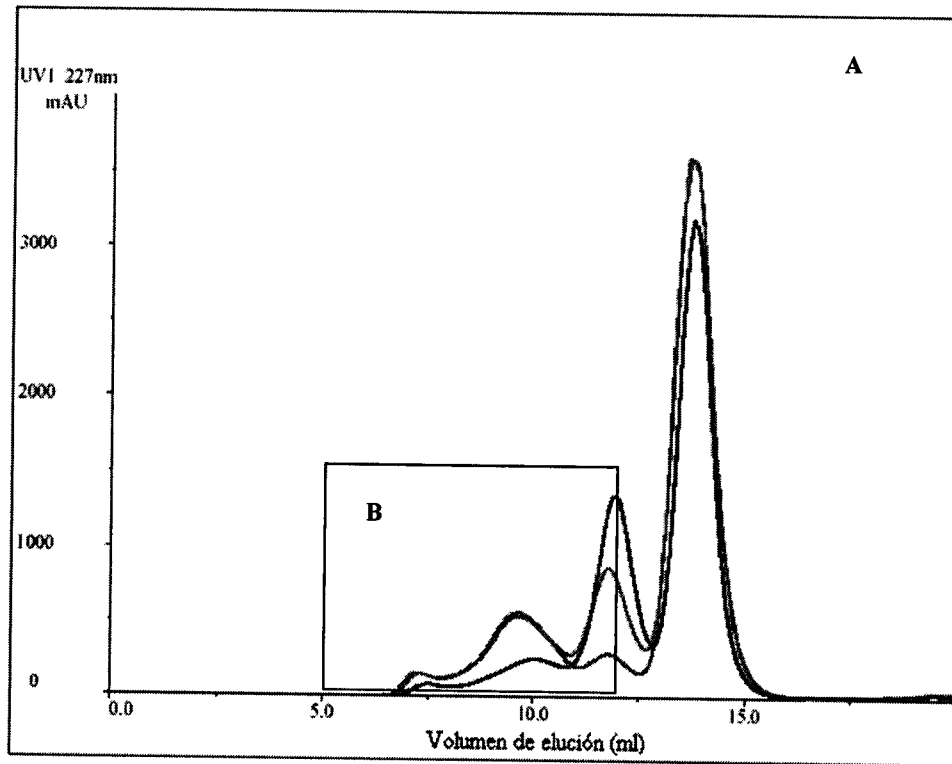


FIGURA 12

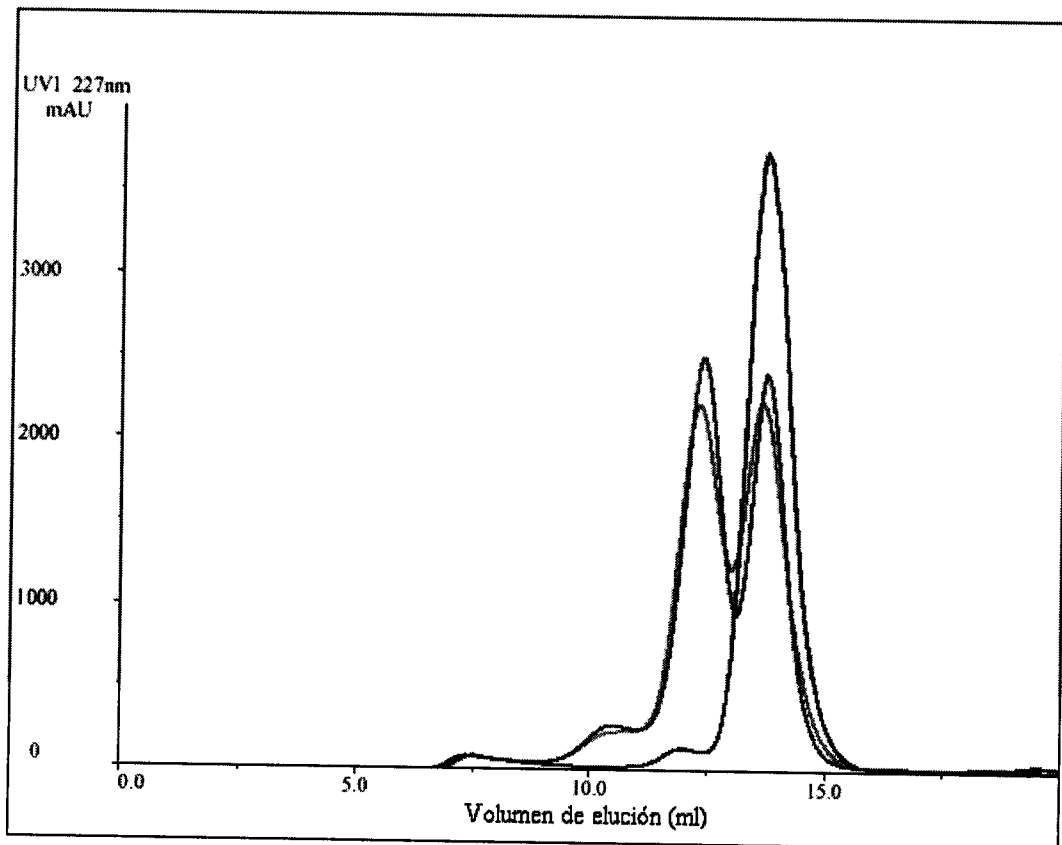


FIGURA 13

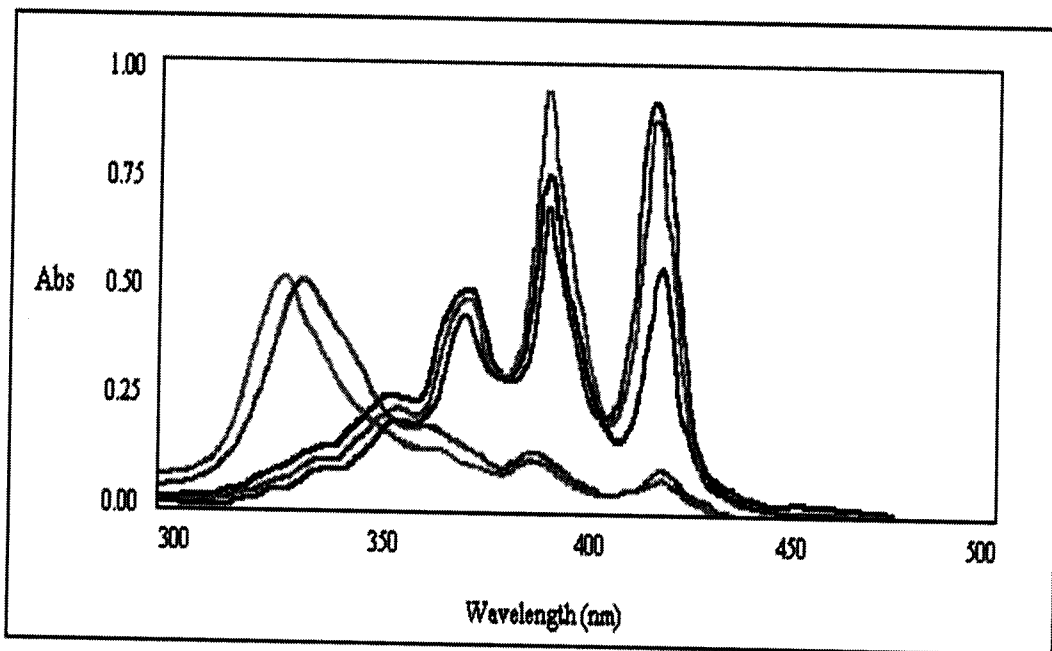


FIGURA 14

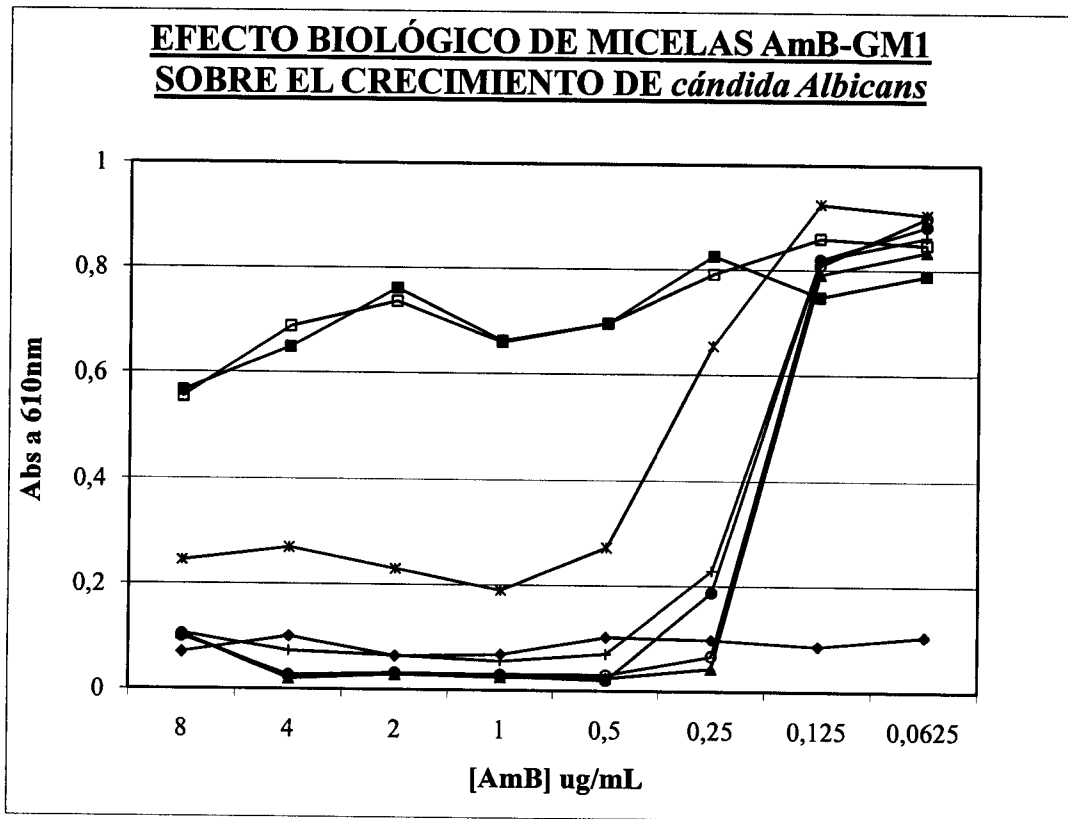


FIGURA 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2011/070174

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, REGISTRY, CAS, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007082855 A1 (VELDMAN ET AL.) 12.04.2007, paragraphs [0011], [0014]-[0018], [0043]-[0065], [0302]-[0322], [0384], [0395], [0454], [0488]-[0492].	1-16, 19, 45, 46
X	EP 1655038 A1 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 10.05.2006, paragraphs [0001], [0026]-[0030], [0047], [0069], [0073], [0079]; examples 29, 31, 37, 39, 42.	1-16, 45, 46, 48
X	EP 1980243 A1 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED; NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 15.10.2008, paragraphs [0001], [0017], [0034]-[0038], [0059], [0079]; example 1.	1-16, 45, 46

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
16/06/2011

Date of mailing of the international search report
(27/07/2011)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
N. Vera Gutierrez

Telephone No. 91 3495544

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2011/070174

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006068890 A2 (TRANSAVE INC.) 29.06.2006, page 4, line 20 – page 5, line 2; page 9, line 29; page 10, lines 4, 13, 29, 30; page 12, lines 17-20; page 13, lines 17-18; page 18, lines 3-5; page 25, lines 27-33; examples.	1-5
X	JP 8034746 A (ZH KANAGAWA KAGAKU GIJUTSU ACAD) 06.02.1996 (abstract). [online][retrieved on 07.06.2011]. Retrieved from: WPI Database; DW 199615; n° acceso 1996-146889[15] & Retrieved of: HCAPLUS in STN; Chemical Abstracts Service (Columbus, Ohio, EEUU); n° acceso 1996:241832.	1, 2, 5-16
X	CN 101439020 A (SHENYANG WOSEN MEDICINE RES INST) 27.05.2009 (abstract). [online][retrieved the 06.06.2011]. Retrieved from: WPI Database; DW 200951; n° acceso 2009-K09850[51].	1-5
X	CN 101439032 A (SHENYANG WOSEN MEDICINE RES INST) 27.05.2009 (abstract). [online][retrieved the 06.06.2011]. Retrieved from: WPI Database; DW 200956; n° acceso 2009-K09848[56].	1-5
X	CN 101439033A (SHENYANG WOSEN MEDICINE RES INST) 27.05.2009 (abstract). [online][retrieved the 06.06.2011]. Retrieved from: WPI Database; DW 200956; n° acceso 2009-K09847[56] & Retrieved from HCAPLUS in STN; Chemical Abstracts Service (Columbus, Ohio, EEUU); n° acceso 2009:653975.	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2011/070174

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2007082855 A	12.04.2007	WO2005046637 A EP1686959 AB US7915227 B AT434431 T ES2329374 T	26.05.2005 09.08.2006 29.03.2011 15.07.2009 25.11.2009
----- EP1655038 A	----- 10.05.2006	WO2005011632 A CN1863508 A US2007160657 A	10.02.2005 15.11.2006 12.07.2007
----- EP1980243 A	----- 15.10.2008	WO2007089043 A CA2640598 A US2009169610 A	09.08.2007 09.08.2007 02.07.2009
----- WO2006068890 A	----- 29.06.2006	CA2588442 A AU2005319508 A US2006159712 A EP1830813 A JP2008523151 T	29.06.2006 29.06.2006 20.07.2006 12.09.2007 03.07.2008
----- JP8034746 A	----- 06.02.1996	JP3499604B2 B	23.02.2004
----- CN101439020 A	----- 27.05.2009	NONE	
----- CN101439032 A	----- 27.05.2009	NONE	
----- CN101439033 A	----- 27.05.2009	NONE	
-----	-----		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070174

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K9/107 (2006.01)
A61K31/337 (2006.01)
A61K31/704 (2006.01)
A61K31/7048 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)
A61P31/10 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070174

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, REGISTRY, CAS, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	US 2007082855 A1 (VELDMAN ET AL.) 12.04.2007, párrafos [0011], [0014]-[0018], [0043]-[0065], [0302]-[0322], [0384], [0395], [0454], [0488]-[0492].	1-16, 19, 45, 46
X	EP 1655038 A1 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 10.05.2006, párrafos [0001], [0026]-[0030], [0047], [0069], [0073], [0079]; ejemplos 29, 31, 37, 39, 42.	1-16, 45, 46, 48
X	EP 1980243 A1 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED; NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 15.10.2008, párrafos [0001], [0017], [0034]-[0038], [0059], [0079]; ejemplo 1.	1-16, 45, 46

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
16/06/2011

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
27 de julio de 2011 (27/07/2011)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
N. Vera Gutierrez
Nº de teléfono 91 3495544

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2011/070174

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	WO 2006068890 A2 (TRANSAVE INC.) 29.06.2006, página 4, línea 20 – página 5, línea 2; página 9, línea 29; página 10, líneas 4, 13, 29, 30; página 12, líneas 17-20; página 13, líneas 17-18; página 18, líneas 3-5; página 25, líneas 27-33; ejemplos.	1-5
X	JP 8034746 A (ZH KANAGAWA KAGAKU GIJUTSU ACAD) 06.02.1996 (resumen). [online][recuperado el 07.06.2011]. Recuperado de: WPI Database; DW 199615; n° acceso 1996-146889[15] & Recuperado de: HCAPLUS en STN; Chemical Abstracts Service (Columbus, Ohio, EEUU); n° acceso 1996:241832.	1, 2, 5-16
X	CN 101439020 A (SHENYANG WOSEN MEDICINE RES INST) 27.05.2009 (resumen). [online][recuperado el 06.06.2011]. Recuperado de: WPI Database; DW 200951; n° acceso 2009-K09850[51].	1-5
X	CN 101439032 A (SHENYANG WOSEN MEDICINE RES INST) 27.05.2009 (resumen). [online][recuperado el 06.06.2011]. Recuperado de: WPI Database; DW 200956; n° acceso 2009-K09848[56].	1-5
X	CN 101439033A (SHENYANG WOSEN MEDICINE RES INST) 27.05.2009 (resumen). [online][recuperado el 06.06.2011]. Recuperado de: WPI Database; DW 200956; n° acceso 2009-K09847[56] & Recuperado de HCAPLUS en STN; Chemical Abstracts Service (Columbus, Ohio, EEUU); n° acceso 2009:653975.	1-5

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2011/070174

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2007082855 A	12.04.2007	WO2005046637 A EP1686959 AB US7915227 B AT434431 T ES2329374 T	26.05.2005 09.08.2006 29.03.2011 15.07.2009 25.11.2009
EP1655038 A	10.05.2006	WO2005011632 A CN1863508 A US2007160657 A	10.02.2005 15.11.2006 12.07.2007
EP1980243 A	15.10.2008	WO2007089043 A CA2640598 A US2009169610 A	09.08.2007 09.08.2007 02.07.2009
WO2006068890 A	29.06.2006	CA2588442 A AU2005319508 A US2006159712 A EP1830813 A JP2008523151 T	29.06.2006 29.06.2006 20.07.2006 12.09.2007 03.07.2008
JP8034746 A	06.02.1996	JP3499604B2 B	23.02.2004
CN101439020 A	27.05.2009	NINGUNO	
CN101439032 A	27.05.2009	NINGUNO	
CN101439033 A	27.05.2009	NINGUNO	

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A61K9/107 (2006.01)

A61K31/337 (2006.01)

A61K31/704 (2006.01)

A61K31/7048 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

A61P31/10 (2006.01)